

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS

UNIDAD DOCENTE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR



Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS
SOMATOSTATINÉRGICO E INMUNOLÓGICO Y
MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA
ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE
EXPERIMENTAL CRÓNICA RECIDIVANTE Y
EFECTO DE UNA SAL DE FOSFATO DE
ETANOLAMINA**

Aránzazu Perianes Cachero

2014

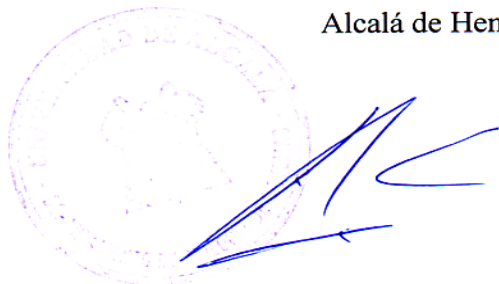
Directores: Eduardo Arilla Ferreiro y Lilian Puebla Jiménez

Antonio Jiménez Ruiz, Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que **Dña. Aránzazu Perianes Cachero** ha realizado la Tesis Doctoral titulada "*Evaluación de los sistemas somatostatinérgico e inmunológico y marcadores de estrés oxidativo en la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante y efecto de una sal de fosfato de etanolamina*", bajo la dirección de los doctores D. Eduardo Arilla Ferreiro y Dña. Lilian Puebla Jiménez en el Grupo de Neurobioquímica, dentro del programa de Doctorado "Señalización Celular" del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 30 de Abril de 2014.



Eduardo Arilla Ferreiro, Catedrático del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y **Lilian Puebla Jiménez**, profesora Titular del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

INFORMAN:

Que **Dña. Aránzazu Perianes Cachero** ha realizado la Tesis Doctoral titulada "*Evaluación de los sistemas somatostatinérgico e inmunológico y marcadores de estrés oxidativo en la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante y efecto de una sal de fosfato de etanolamina,*" bajo nuestra dirección en el Grupo de Neurobioquímica, dentro del programa de Doctorado "Señalización Celular" del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 30 de Abril de 2014.



Eduardo Arilla Ferreiro



Lilian Puebla Jiménez

A mis padres y a Jesús

En el laboratorio, entre tubos, papeles, centrífugas y con el ruido del vórtex de fondo, empiezo a escribir mis agradecimientos y me doy cuenta que esta etapa de mi vida llega a su fin. Han sido muchos años de ilusión, de esfuerzo, de alegrías y de errores que me han hecho amar este trabajo y, porque no decirlo, a veces me han frustrado. A lo largo de este tiempo he conocido a mucha gente que me ha enseñado y ayudado tanto en el ámbito profesional como en el personal y por ello quisiera agradecerse.

Estas primeras líneas son para mis directores de tesis. Eduardo y Lilian, gracias por la confianza que depositasteis en mí cuando me abristeis las puertas del laboratorio, por aceptar ser mis maestros y enseñarme que con tesón, podemos alcanzar cualquier meta. Con vosotros he crecido como investigadora y como persona.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio. A Alberto, has sido otro de mis mentores y además un gran amigo. Gracias por tu forma de ser, por tu paciencia en mis interrogatorios, por motivarme cuando las cosas no me salían, por los ratos de “cultivos”, por tantos momentos inolvidables. A Carmen, has llegado hace poco al laboratorio con una gran energía e ilusión que me ha hecho valorar lo que tengo y además, me has enseñado a ver otras posibilidades. Siempre has estado dispuesta a ayudar y echar una mano cuando lo necesitaba. Gracias por todo ello. A María Amparo, hemos compartido muchos momentos juntas en el laboratorio y fuera de él, siempre me has ayudado y me has escuchado y, aun en la distancia, sigues animándome. Gracias.

A Luis y a Nuria, vosotros en estos años os habéis convertido en uno de mis puntos de apoyo tanto dentro como fuera de la Universidad. Luisito, tu energía, tu simpatía y tu forma de ser son excepcionales. Siempre estás dispuesto a ayudar, haces todo lo posible para integrarnos a todos y, además, organizas los mejores torneos de la Universidad. Nuria, tu alegría y tu espíritu son cautivadores. Eres capaz de arrojar luz hasta en el día más oscuro. Siempre me has escuchado y me has ayudado a encontrar el camino, te has convertido sin ninguna duda en “mi hermanita mayor”. Vuestra amistad es uno de los mejores regalos que me llevo de estos años.

A mis “Guijarros” Borja, Patri y David. Chicos, gracias por estar al otro lado del pasillo, con vosotros nunca me he sentido sola (aunque no hubiera nadie en el laboratorio). Me habéis ayudado, cuidado, animado y me encanta poder decir que

además de compañeros os puedo llamar amigos. Borja, aunque me llamaras “bióloga de panadería” recuerdo con muchísimo cariño todas las horas que hemos estado hablando de ciencia y la gran cantidad de ideas que me has dado. Has sido una inspiración.

A las chicas del laboratorio 3 Cecilia, Ágata y Alicia. Aunque estáis en el piso de arriba vuestra alegría inunda los pasillos. Siempre preparadas y dispuestas para echar una mano. Gracias.

Al resto de compañeros del departamento y entre ellos a Eva, Laura, David, Sophie, Luisote, María, Irene, Nadia, María Úbeda y Ana(s). A algunos de vosotros os he podido conocer más y a otros menos. Hemos estado juntos en clase, en prácticas, en congresos y en reuniones. He compartido con vosotros risas y desesperaciones. Todos habéis ayudado a hacer de este sitio un lugar mucho más agradable y me llevo un grandísimo recuerdo de todos vosotros.

A M^a Val y Maribel, muchísimas gracias por haberme acogido en vuestro laboratorio las interminables horas del microscopio y enseñarme un poco el mundo de la histología. A Silvia, eres un terremoto, siempre corriendo y ayudando a todo el mundo. Gracias.

A Miguel Ángel Lasunción y Rebeca del Hospital Ramón y Cajal y a Vicente del Hospital Niño Jesús. Gracias por permitirme colaborar con vosotros en diferentes proyectos de investigación que me han permitido conocer otras áreas de la biología.

A Angélica, siempre has estado ahí, gracias por tu amabilidad, por tu comprensión, por tu cariño y por ayudarme con toda la burocracia. A Miguel, gracias por ser el manitas que arregla todo, por ayudarme en prácticas aunque siempre con un precio “30 euros”.

A todo el profesorado del departamento de Bioquímica. Os agradezco además de vuestro ánimo constante, la confianza que depositasteis en mí, para poder ayudar en las prácticas. En especial a Lola Román, Lola Fernández, Miguel Ángel, Menchu, Nieves, Pilar(es), Luis, Ángel Herráez y Juan Carlos, vuestros consejos e ideas han sido importantísimos estos años.

A José María, Ángel, Mariano, Montse y al resto del personal de CEA. Con vosotros he aprendido muchísimo sobre animales. Cuánta paciencia habéis tenido, cuántas dudas me habéis solucionado, y siempre con una sonrisa.

A Juan y a Guillermo. Tengo que daros las gracias por vuestra ayuda y por vuestra paciencia. Ahora aquí, sin que nadie se entere, os tengo que confesar que el simple hecho de saber que estabais a dos pasos, me daba la seguridad suficiente para poder marcar la somatostatina.

A Isabel y Cristina de la Unidad de Cultivos por haber trabajado codo con codo conmigo las interminables horas del citómetro.

A Eugenio, Alberto, Paula y María. Sin vuestros cafés especiales con espuma, vuestras palabras amables y vuestros vaciles, estos años no hubieran sido tan agradables.

Otras “pequeñas” personas a las que quiero agradecer son a Marta, Sergio y Raquel. Gracias por dejarme enseñaros y aprender de vosotros. Me habéis hecho recordar muchas cosas que tenía olvidadas.

A mi gran familia, mis yayos, mis abuelos, mis tíos, mis primos y los nuevos miembros Lola, Jesús, Miguel y Fuen. Vuestra comprensión y vuestro apoyo hasta el final han sido de gran importancia estos años.

A mis amigos del barrio, Fran “el Niño”, David “Ozy”, Esther, Ana y Pablo. Chicos, llevamos muchos años juntos y creo que nunca os he dado las gracias por estar siempre a mi lado, por escuchar mis historietas sobre ratas, poner cara de entender los problemas con mis experimentos y resistir estoicamente mis agobios. Con estas líneas quiero remediar eso y agradeceros todo el apoyo que me habéis brindado. Es un orgullo teneros como mi familia urbana.

Estas últimas líneas las reservo para agradecer a los tres pilares de mi vida:

A mis padres Alfredo y Blanca. Desde siempre habéis hecho lo imposible para que pudiera lograr mis sueños, me habéis motivado, animado, sustentado y soportado. Esta tesis es el fruto de todo ello. Sin vuestro cariño y apoyo incondicional no sería la mujer que soy hoy.

A mi novio Jesús. Me siento muy afortunada de contar con tu cariño y comprensión. Necesito agradecerte todo el tiempo que has estado conmigo, has sido mi consejero, mi hombro para desahogarme, mi razón y mi cordura. Me has escuchado y apoyado en los momentos buenos y malos y has sabido esperar, por todo ello este trabajo también es tuyo.

*Por último hago mía la frase de M. Gonzalo Claros Díaz “**Donde me he equivocado, soy el único responsable; donde no, el mérito es de los que me han ayudado e inspirado**”.*

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad neuroinflamatoria crónica desmielinizante más común del sistema nervioso central (SNC) y representa la causa no traumática más frecuente de invalidez en el adulto joven. Clínicamente, se caracteriza por la aparición de alteraciones neurológicas que tienen lugar en múltiples episodios denominados brotes, seguidos de periodos de remisión en los que desaparecen los síntomas clínicos. Se desconocen con exactitud los factores que la desencadenan, así como los mecanismos moleculares y celulares implicados en su desarrollo. En este trabajo, se han inmunizado ratas Lewis hembras de cinco semanas de edad con un extracto de médula espinal de cobaya para inducir la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante (EAE-CR), la cual se utiliza como modelo animal de dicha enfermedad ya que presenta alteraciones clínicas y anatomopatológicas similares a la EM. Se analizaron distintos parámetros inmunológicos y bioquímicos así como el efecto de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina sobre los mismos, a lo largo de tres periodos de la enfermedad: primer brote, periodo entre brotes y segundo brote. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que en el primer y segundo brote de la enfermedad, los signos clínicos observados en las ratas con EAE-CR coinciden con pérdida de peso y disminución de la tasa de ingesta. Además, las ratas con EAE-CR pretratadas con la sal de PEA presentan un retraso en la aparición de los signos clínicos y una disminución en la severidad de los mismos. Este estudio demuestra, por primera vez, que en este modelo animal existen modificaciones en las poblaciones linfocitarias de sangre periférica y bazo, grandes infiltrados inflamatorios en áreas cerebrales dedicadas al control del movimiento, como es el cerebelo, así como en áreas relacionadas con procesos cognitivos, como son el hipocampo y los cuerpos mamilares. Además, en el hipocampo de ratas con EAE-CR, se han detectado modificaciones en los niveles proteicos y en las actividades de enzimas antioxidantes como son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). Asimismo, dichas ratas presentan un aumento en los niveles de colesterol en las membranas celulares de hipocampo y alteraciones funcionales del sistema somatostatinérgico. El tratamiento de estas ratas con la sal de PEA previene o atenúa dichas alteraciones. Por consiguiente, la sal de PEA podría ser un candidato potencial para el tratamiento de la EM.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic neuroinflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) and is the most common non-traumatic cause of disability in young adults. Clinically, it is characterized by the appearance of neurological deficits that take place in multiple relapses followed by periods of remission in which the clinical symptoms disappear. The factors that trigger it, as well as the underlying molecular and cellular mechanisms involved in its development are yet unclear. In this work, we immunized female Lewis rats, five weeks of age, with a guinea pig spinal cord extract in order to induce chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR-EAE), which is used as an animal model of MS due to the clinical and pathological similarities with MS. We analyzed several immunological and biochemical parameters as well as the effect of calcium, magnesium and potassium phosphoethanolamine salt on these parameters along three periods of the disease: first relapse, remission and second relapse. The results obtained in this study show that the clinical signs observed in rats with CR-EAE in the first and second relapse match with weight loss and a decreased rate of food intake. We also observed that those rats with the CR-EAE pretreated with PEA salt exhibited a delayed onset of the clinical signs as well as a decrease in the severity of the symptoms. This study also demonstrates, for the first time, that there are significant changes in lymphocyte populations from peripheral blood and spleen, large inflammatory infiltrates in brain areas dedicated to motor control, such as the cerebellum, as well as in areas related to cognitive processes, such as the hippocampus and mammillary bodies. In addition, in the hippocampus of rats with CR-EAE, changes in the protein levels and activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were detected. Moreover, these rats present an increase in cholesterol content in the hippocampal cell membranes and functional alterations of the somatostatinergic system. Treatment of these rats with the PEA salt prevented or attenuated these alterations. Altogether, these data suggest that the PEA salt might be a potential candidate for the treatment of MS.

Abreviaturas

“No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas”
[Rita Levi Montalcini]

GUÍA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y NOMENCLATURA

¹O₂ : Oxígeno singlete	B7-1 y B7-2 : Proteínas coactivadoras de linfocitos T
ACF : Adyuvante completo de Freund	Bcl-2 : Proteína <i>B cell lymphoma 2</i>
ACm : Adenilato ciclasa de membrana	BCR : Receptor específico de linfocito B
ACs : Adenilato ciclasa soluble	BDNF : Factor neurotrófico del cerebro
ACTH : Adenocorticotropina	BHE : Barrera hematoencefálica
ADCC : Citotoxicidad dependiente de anticuerpo	BHT : 2, 6-di-ter-butil-4-metilfenol
ADH : Hormona antidiurética	BSA : Albumina sérica bovina
ADN : Ácido desoxirribonucleico	C57BL/6 : Cepa de ratón
AFFIRM : Ensayos clínicos multi-centro doble ciego	CA : Cuerno de Amón
Ag : Antígeno	Ca²⁺ : Calcio
AKT : Proteína quinasa B/PKB	CaM : Calmodulina
AMPA : Receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	CAT : Catalasa
AMPc : Adenosin monofosfato cíclico	CB1 : Receptores de cannabinoides 1
AP-1 : Proteína activadora 1	CBP : Proteína de unión a CRE
APC : Célula presentadora de antígeno	CCL : Ligando de quimioquina
AQP4 : Acuaporina	CCR : Receptor de quimioquina
AR : Receptor adrenérgico	CD : Célula dendrítica
ARN : Ácido ribonucleico	CD (n°) : <i>Cluster of Differentiation</i>
ARNm : Ácido ribonucleico mensajero	CHO : Línea celular de ovario de hámster chino
ATP : Adenosin trifostato	CK : Creatina quinasa
AtT-20 : Línea celular de pituitaria	COX : Ciclooxygenasa

CP: Creatinina Fosfato

CPO: Célula precursor de oligodendocito

CREB: Proteína de unión a CRE

CSF: Factor estimulador de colonias

CXC: Quimiocina

D2R: Receptor dopaminérgico 2

DAG: Diacilglicerol

DEGP: Dietilpirocarbonato

DEP-1: Fosfotirosina fosfatasa de alta densidad -1

DLG: Molécula ensambladora

DMEM: Medio de Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPTA: Ácido dietilentriaminotetraacético

DTNB: Ácido-5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental

EAE-CR: Encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante

EBV: Virus de Epstein Barr

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)-NNN'-tetracético

EM: Esclerosis múltiple

EMA: Agencia europea del medicamento

EMPP: Esclerosis múltiple progresiva primaria

EMPS: Esclerosis múltiple progresiva secundaria

EMRR: Esclerosis múltiple recurrente remitente

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FDA: *Food and drug administration*

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FK: Forskolina

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster

GABA: Ácido gamma-amino-butírico

GAM: Glicoproteína asociada a mielina

GD: Giro dentado

GEF: Intercambiador de nucleótido de guanina

GFAP: Proteína ácida fibrilar

GH: Hormona del crecimiento

Gi: Proteína G inhibitoria

GMPC: Guanosín 3',5'-monofosfato cíclico

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

GPx: Glutation peroxidasa

GR: Glutation reductasa

GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides

GRK: Proteínas quinasas de los GPCR

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado

GSH-t: Glutation total

GTP: Guanosín 5'-trifosfato

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HBSS: *Hank's Balance Salt Solution*

HClO: Ácido hipocloroso

HEK-293: Línea celular de riñón humano

HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanosulfónico

HLA: Antígeno leucocitario humano

HO[•]: Radical hidroxilo

HV: Herpes Virus

Iba-1⁺: Molécula adaptadora de unión de calcio ionizado.

IBMX: 3-Isobutil-1-metilxantina

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IFN-γ: Interferón gamma

IGF-1: Insulin growth factor

Igs: Inmunoglobulinas

IL: Interleuquina

K⁺: Potasio

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LFA: Molécula de adhesión celular

LT: Linfotóxina

LTP: Potencial de largo plazo

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama

Mg²⁺: Magnesio

MGAGNIMS: *Magnetic Resonance Network in Multiple Sclerosis*

MHC: Molécula de histocompatibilidad

Mia; PaCa: Líneas celulares de cáncer de páncreas

MMP: Metaloproteasa de matriz

MOG: Glicoproteína de oligodendrocito

MOR1: Receptores μ de opiáceos

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBT: Cloruro de nitroblue tetrazolium

NK: *Natural Killer*

NKT: Célula NK que expresa receptor TCR

NMDA: N-metil-D-Aspartato

NMO: Neuritis óptica

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOSi: Óxido nítrico sintasa inducible

NST: Neuronostatina

O^{2•-}: Anión superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

P1, P2, P3: Promotores

PBM: Proteína básica de mielina

PC: Prohormona convertasa

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PE: Ficoeritrina

PE: Fosfatidiletanolamina

PEA: Sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PIM1- α : Proteína inflamatoria de macrófagos 1

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLA2: Fosfolipasa A2

PLC: Fosfolipasa C

PLP: Proteína proteolipídica

PreBötzc: Complejo preBötzing

PRL: Prolactina

PTP: Fosfotirosina fosfatasa

PTX: Toxina pertusis

PUFA: Ácido graso poliinsaturado

PVDF: Membranas de polifluoruro de vinilideno

RM: Resonancia magnética

RMN: Resonancia magnética nuclear

RPTP: Receptor de fosfotirosina fosfatasa

S1P-R: Receptor de esfingosina 1 fosfato

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEF-2: Factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico

SFB: Suero fetal bovino

SH2: Dominio de homología con la quinasa Scr

SI: Sistema inmune

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SOD: Superóxido dismutasa

SOD230: Parasiteótido

SST: Somatostatina

SST-IR: Somatostatina inmunoreactiva

SSTR: Receptor de somatostatina

STI: Inhibidor de tripsina de soja

T3: Triyodotironina

T4: Tiroxina

T47D: Línea celular de cáncer de mama

TASTE: 3-Aminopropiltriethoxisilano

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

Tc: Linfocito T citotóxico

TCA: Ácido tricloroacético

TCR: Receptor específico de linfocito T

TEA: Trietanolamina

TEMED: N,N,N,N Tetrametilendiamina

TGF- β : Factor de crecimiento transformante - β

Th: Linfocito T colaborador

Tris: Tris-hidroximetil-amino-metano

TMD: Dominio transmembrana

TMEV: Virus de la encefalomiелitis murina de Theiler

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TNRF: Receptor del factor de necrosis tumoral

TRE: Elemento de respuesta a hormona tiroidea

T_{reg}: Linfocito T regulador

TSH: Hormona estimulante del tiroides

TUNEL: Marcaje del extremo 3'-OH libre por la desoxinucleotidil transferasa terminal

VCAM: Molécula de adhesión de célula vascular

VIP: Péptido vasointestinal

Índice

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano,
siempre se aplican”.*
[Severo Ochoa]

INDICE

Introducción.....	1
1. Esclerosis múltiple.....	3
1.1. Historia de la esclerosis múltiple	3
1.2. Definición de la esclerosis múltiple	3
1.3. Epidemiología de la Esclerosis múltiple.....	3
1.4. Etiología de la Esclerosis múltiple.....	4
1.4.1. Factores genéticos	4
1.4.2. Factores víricos	5
1.4.3. Factores ambientales y de género	6
1.5. Modelos experimentales de la esclerosis múltiple.....	7
1.6. Patogenia de la esclerosis múltiple	8
1.6.1. Fase inmunológica de la EM.....	9
1.6.1.1. Sistema inmune.....	9
1.6.1.1.1. Componentes celulares del sistema inmune	9
1.6.1.1.2. Componentes moleculares del sistema inmune	11
1.6.1.2. Implicación del sistema inmune en la EM.....	13
1.6.2. Fase degenerativa progresiva	22
1.6.2.1. Estrés oxidativo	22
1.6.2.2. Estrés oxidativo en la EM.....	27
1.7. Histopatología de la esclerosis múltiple	30
1.8. Manifestaciones clínicas de la esclerosis múltiple	32
1.9. Diagnóstico de la esclerosis múltiple.....	33
1.10. Tratamientos de la esclerosis múltiple.....	34
1.10.1. Terapias inmunomoduladoras de la EM	35
1.10.2. Terapia antioxidante en la EM	37
1.10.3. Sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina.....	39
2. El sistema somatostatinérgico	41
2.1. Descubrimiento de la somatostatina	41
2.2. Estructura de la somatostatina	42
2.3. Biosíntesis de la somatostatina	44
2.3.1. Estructura del gen de la somatostatina	44
2.3.2. Biosíntesis de la somatostatina	44



2.3.3. Regulación de la expresión y secreción de la somatostatina.....	46
2.4. Distribución de la somatostatina.....	50
2.5. Acciones fisiológicas de la somatostatina	53
2.5.1. Acciones fisiológicas a nivel periférico	54
2.5.2. Acciones fisiológicas a nivel cerebral.....	55
2.6. Mecanismo de acción de la somatostatina	57
2.6.1. Receptores de somatostatina	57
2.6.2. Estructura de los genes que codifican los receptores de somatostatina	60
2.7. Regulación de los receptores de somatostatina.....	64
2.7.1. Regulación de los SSSTR a nivel del gen	64
2.7.2. Regulación dependiente de agonista	64
2.7.3. Dimerización de los receptores de SST	67
2.7.4. Homodimerización de los SSSTR.....	67
2.7.5. Heterodimerización de los SSSTR	68
2.7.6. Heterodimerización de la familia de SSSTR.....	68
2.7.7. Heterodimerización de los SSSTR con receptores opiáceos.....	68
2.7.8. Heterodimerización de los SSSTR con receptores dopaminérgicos	69
2.7.9. Heterodimerización de los SSSTR con receptores adrenérgicos	69
2.8. Distribución de los SSSTRS	70
2.9. Vías de señalización acopladas a los receptores de somatostatina	73
2.9.1. Proteínas G	73
2.9.1. Vías implicadas en la inhibición de la secreción celular.....	74
2.9.1.1. Adenilato ciclasa.....	74
2.9.1.2. Canales de potasio	76
2.9.1.3. Canales de calcio	77
2.9.1.4. Vesículas de secreción	78
2.9.2. Vías de señalización implicadas en la inhibición de la proliferación celular por la SST.....	79
2.9.2.1. Bomba de Na^+/H^+	79
2.9.2.2. Fosfotirosina fosfatasas	80
2.9.2.3. Fosfolipasas	82
Objetivos.....	85
Materiales y Métodos	91
1. Reactivos	93



2. Animales y modelo de experimentación	99
2.1. Animales de experimentación.....	99
2.2. Modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante.....	99
2.2.1. Extracción de médula espinal de cobaya	99
2.2.2. Modelo experimental	100
2.2.3. Tratamiento con la sal de fosfato de etanolamina (PEA).....	101
3. Obtención de linfocitos de sangre periférica y de bazo	101
3.1. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica	101
3.2 Obtención de linfocitos de bazo.....	104
4. Estudio inmunofenotípico de las poblaciones linfocitarias de sangre periférica y bazo por citometría de flujo	106
5. Determinación de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias TNF-α e IFN-γ	109
5.1. Obtención de suero	109
5.2. Determinación de los niveles de citoquinas.....	109
6. Disección del hipocampo.....	110
6.1. Extracción del encéfalo.....	110
6.2 Disección del hipocampo.....	111
7. Obtención de membranas celulares, fracción citoplasmática y fracción soluble de hipocampo.....	112
7.1. Obtención de membranas y fracción citoplasmática	112
7.2. Obtención de la fracción soluble de hipocampo	113
8. Marcaje de Tyr¹¹-somatostatina-14 con Na¹²⁵I	113
8.1. Preparación de la columna	114
8.2. Marcaje	115
8.3. Purificación.....	115
8.4. Test de adsorción a talco.....	116
9. Determinación de los niveles de somatostatina tisular	117
9.1. Extracción de la somatostatina tisular	117
9.2. Determinación de los niveles de somatostatina tisular	117



10. Unión de la somatostatina a sus receptores específicos en membranas de hipocampo	118
11. Inmunodetección de proteínas	120
11.1. Preparación de los geles.....	120
11.2. Preparación de las muestras	121
11.3. Electroforesis y transferencia.....	121
11.4. Inmunodetección.....	122
12. Estudio de la actividad adenilato ciclasa.....	123
13. Medida de la peroxidación lipídica.....	129
14. Determinación de los niveles de glutathion	130
14.1. Extracción del glutathion	131
14.2. Determinación de los niveles de glutathion total (GSH-t).....	131
14.3. Determinación de los niveles de glutathion oxidado (GSSG)	132
15. Determinación de la actividad enzimática de la glutathion reductasa y de la glutathion peroxidasa.....	132
15.1 Determinación de la glutathion reductasa.....	132
15.2. Determinar de la actividad glutathion peroxidasa.	134
16. Determinación de la actividad catalasa (CAT).....	135
17. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)	136
17.1. Extracción de la enzima.....	137
17.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)	137
18. Análisis inmunohistoquímico de tejido cerebral	138
19. Técnica de coloración de vainas de mielina	141
20. Determinación de nucleos apoptóticos in situ.....	142
21. Evaluación de los datos histológicos	143
22. Análisis estadístico	144
23. Gestor bibliográfico	144
Resultados	145



A. Evolución de los signos clínicos de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante y el efecto de una sal de fosfato de etanolamina	147
B. Sistema inmunológico.....	151
B.1. Sangre periférica	151
B.2. Bazo.....	153
C. Estudios histológico	157
C.1. Cerebelo	157
C.2. Cuerpos mamilares.....	170
C.3. Hipocampo	182
D. Estado de las defensas antioxidantes en el hipocampo de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante.....	200
D.1. Peroxidación lipídica	200
D.2. Defensas antioxidantes.....	201
D.2.1. Actividad y niveles de superóxido dismutasa	202
D.2.2. Actividad y niveles de la catalasa	203
D.2.3. Sistema del glutathion	205
D.2.3.1. Glutathion peroxidasa y glutathion reductasa.....	205
D.2.3.2. Niveles de glutathion total, reducido y oxidado	208
D.3. Niveles de colesterol y desmosterol.....	210
E. Expresión de las quinasas de receptores acoplados a proteínas G y β-arrestinas en el hipocampo de ratas con EAE-CR y efecto de la sal de PEA	211
F. Estudio del sistema somatostatinérgico en el hipocampo de ratas con EAE-CR y efecto de la sal de PEA	215
F.1. Expresión de la somatostatina	215
F.2. Receptores de somatostatina.....	216
F.2.1. Parámetros de unión de la somatostatina a sus receptores.....	216
F.2.2. Expresión de los receptores de somatostatina.....	219
F.3. Vía de señalización de la adenilato ciclasa.....	223
F.3.1. Funcionalidad de la adenilato ciclasa	223
F.3.2. Expresión de la adenilato ciclasa	224
F.4. Expresión de las proteínas Gi	227
Discusión.....	229



Conclusiones	259
Bibliografía.....	265
Anexo	299
Publicaciones científicas	301
Financiación.....	304
Índice de figuras y tablas:.....	305

Introducción

*“Todo hombre si se lo propone, puede ser escultor de su propio cerebro”
[Santiago Ramón y Cajal]*

1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1.1. HISTORIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

A mediados del siglo XIX, Robert Carswell y Jean Cruveilhier relacionaron una serie de lesiones encontradas en el sistema nervioso central (SNC) con la paraplejia. Sin embargo, no fue hasta 1869 cuando el profesor Jean-Martin Charcot, autoridad europea en parálisis, describió las características clínicas y anatomopatológicas de una nueva enfermedad previamente confundida con la parálisis, la **esclerosis múltiple (EM)**. Charcot propuso que la EM es una entidad clinicopatológica diferente a la parálisis, al presentar lesiones diseminadas en el tiempo y en el espacio y al manifestarse clínicamente con periodos de déficit neurológico y remisión, con predominio de afectación de la mielina (Moreira y col., 2002).



Figura 1: Jean-Martin Charcot (1825-1893).

1.2. DEFINICIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Hoy en día, la EM se considera la enfermedad neuroinflamatoria crónica y desmielinizante más común del SNC, y representa la causa no traumática más frecuente de invalidez en el adulto joven. Clínicamente se caracteriza por la aparición de alteraciones neurológicas que tienen lugar en múltiples episodios denominados brotes, recidivas o exacerbaciones, seguidos de periodos de remisión en los que desaparecen los síntomas clínicos. Desde el punto de vista anatomopatológico, se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones denominadas placas, formadas por infiltraciones perivenulares de células redondas con desmielinización y gliosis, distribuidas a lo largo de todo el SNC, la médula espinal, el encéfalo y los nervios ópticos.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM tiene una prevalencia a nivel mundial de varios millones de afectados, siendo su distribución desigual en el mundo. En España, los últimos estudios epidemiológicos ofrecidos por la Federación Internacional de EM han mostrado un

aumento del número de casos de EM. Así, en los últimos 15 años, se ha pasado de una incidencia de 50 a 120 casos por cada 100.000 habitantes. En la última publicación de octubre de 2013, se estima que en España hay 46000 casos de EM (MSIF, 2013).

1.4. ETIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Las causas que producen la EM se desconocen, aunque estudios epidemiológicos en pacientes con EM han permitido establecer tres posibles factores que aumentan la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (Sibley y col., 1985, Marrie, 2004, Friesse y Fugger, 2005, 't Hart y col., 2009):

- Factores genéticos
- Factores víricos
- Factores ambientales y de género

1.4.1. Factores genéticos

Se ha observado que dentro de una misma familia, el riesgo de padecer EM aumenta, por lo que el componente genético podría jugar un papel importante en la etiología de la enfermedad. En los últimos diez años, se han identificado y caracterizado mutaciones tanto en el ADN mitocondrial como en el ADN genómico que aumentan la susceptibilidad de padecer la enfermedad. Estudios de rastreo genómico en diferentes poblaciones han identificado regiones cromosómicas discretas potencialmente implicadas en dicha susceptibilidad. Entre ellas destacan cambios en las regiones codificantes para el antígeno leucocitario humano (HLA) (especialmente las modificaciones en los alelos HLA-A*0301 y la HLA-DR15), para el receptor de fosfotirosina fosfatasa tipo C (CD45) de linfocitos, para el receptor de interleuquina 7 (IL-7) e IL-2, CD4, CD6, CD11b, CD58, así como para receptores de glutamato, moléculas ensambladoras multiméricas DLG1 y DLG2 y en genes que codifican para las proteínas de la cadena transportadora de electrones. Además, se ha observado que en las placas escleróticas de la EM, durante los periodos de brote, las células linfocitarias tienen inhibidos los genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas mientras que presentan un aumento de las proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 (Comi y col., 2012).

Por otro lado, se ha observado que la influencia de las mutaciones en el desarrollo de la enfermedad depende del progenitor que las porte. En este sentido, si son

de origen materno, el riesgo de padecer la enfermedad, por parte de los hijos, es el doble que si el portador es el padre (Ramagopalan y col., 2010).

1.4.2. Factores víricos

En 1884, Marie P., discípulo de Charcot, propuso que la EM podría ser una enfermedad causada por agentes infecciosos (Moreira y col., 2002). Desde entonces, se ha planteado la hipótesis de que estos agentes podrían estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad o, al menos, aumentar la susceptibilidad a padecerla. La hipótesis de la infección vírica se basa en el concepto de *mimetismo molecular*. Los complejos moleculares que se producen en respuesta a las infecciones víricas pueden tener una estructura muy similar a los antígenos propios, como es la proteína básica de mielina (PBM), lo que induce una respuesta humoral. Así, se podría explicar los altos niveles tanto de factores humorales como de células T reactivas a proteína básica de mielina encontrados en las lesiones escleróticas típicas de la EM (Bagert, 2009, Ramagopalan y col., 2010, Maghzi y col., 2011, Owens y col., 2011).

Los virus que se han relacionado con la EM son el de la varicela, el herpes virus-6 (HV-6), el virus de Epstein-Barr (EBV) y los coronavirus. Se ha podido aislar material genético de EBV de células B infiltradas dentro de las meninges de pacientes con EM, así como dentro de lesiones en la médula espinal, (Serafini y col., 2007) y también se han encontrado linfocitos T activos contra EBV (Pohl, 2009). Estudios epidemiológicos han revelado que casi el 99% de los pacientes con EM son seropositivos para el virus EBV. Estos datos, aunque muy llamativos, son controvertidos dado que el 73% de la población adulta es seropositiva para el EVB (Bagert, 2009). En casos pediátricos, la relación entre el EVB y la EM es mucho más patente ya que el 83% de los niños con EM son seropositivos para el EBV frente a un 53% de los niños sanos (Alotaibi y col., 2004).

Por otro lado, dos variantes del herpes virus HV-6, HV-6A y HV-6B, se han encontrado en suero y en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM. Además, en periodos de exacerbación de la enfermedad, se han detectado aumentos en los niveles séricos tanto del HV-6 A como del virus de la varicela-zoster (HV-3). El papel que desempeñan dichos virus en el desarrollo de la enfermedad se desconoce pero se ha propuesto que estos virus contribuyen al desarrollo de la EM, aumentando la

inflamación en el SNC (Kakalacheva y Lünemann, 2011, Maghzi y col., 2011, Owens y col., 2011).

1.4.3. Factores ambientales y de género

El origen étnico también es considerado como un factor involucrado en el desarrollo de la EM. Así, por ejemplo, los afroamericanos presentan aproximadamente un 40% menos de riesgo de padecer la enfermedad que la raza caucásica (Ramagopalan y col., 2010). Sin embargo, aunque el número de casos es menor, cuando se manifiesta la enfermedad, posee una mayor virulencia que en la raza caucásica.

A nivel de género, la EM afecta tanto a hombres como a mujeres, si bien la prevalencia en estas últimas es mayor que en los hombres; hay poblaciones en las que llega a ser 3,2 veces mayor. Una posible explicación es el efecto de las hormonas sexuales sobre la barrera hematoencefálica, el sistema inmunológico y las células del parénquima cerebral. En este sentido, se ha descrito que la administración de hormonas esteroideas a mujeres con EM provoca una reducción de los síntomas de la enfermedad (Mao y Reddy, 2010).

Por otro lado, hay distintos factores ambientales que parecen influir en la susceptibilidad a la EM, entre ellos, la latitud y el tabaquismo. Estudios epidemiológicos han mostrado que el mayor número de casos de EM se presentan en las zonas templadas del hemisferio norte y del hemisferio sur y, dentro de estas zonas, a latitudes mayores, por lo que países como Estados Unidos, Canadá, norte de Europa, Australia o Nueva Zelanda presentan mayor número de casos. Esta distribución se ha relacionado con una falta de exposición a la luz solar de tal forma que en latitudes mayores, disminuyen las horas de sol y, como consecuencia, se sintetiza menor cantidad de vitamina D en la piel. Esta hipótesis es avalada por los estudios de Correale y colaboradores (2011), los cuales relacionan las concentraciones en suero de la 25-hidroxivitamina D con el riesgo de padecer EM. Asimismo, se ha propuesto que la vitamina D ejerce efectos inmunomoduladores, por lo que su déficit se relaciona con una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad (t Hart y col., 2009, Correale y col., 2011). Entre los países del norte de Europa, es interesante mencionar a Noruega, un país que por su situación geográfica, debería de presentar un alto número de casos de EM. Sin embargo, los datos muestran que no es así, posiblemente debido al tipo de dieta de

sus ciudadanos, basada principalmente en salmón y aceite de bacalao, alimentos ricos en vitamina D (Ramagopalan y col., 2010, Kakalacheva y Lünemann, 2011).

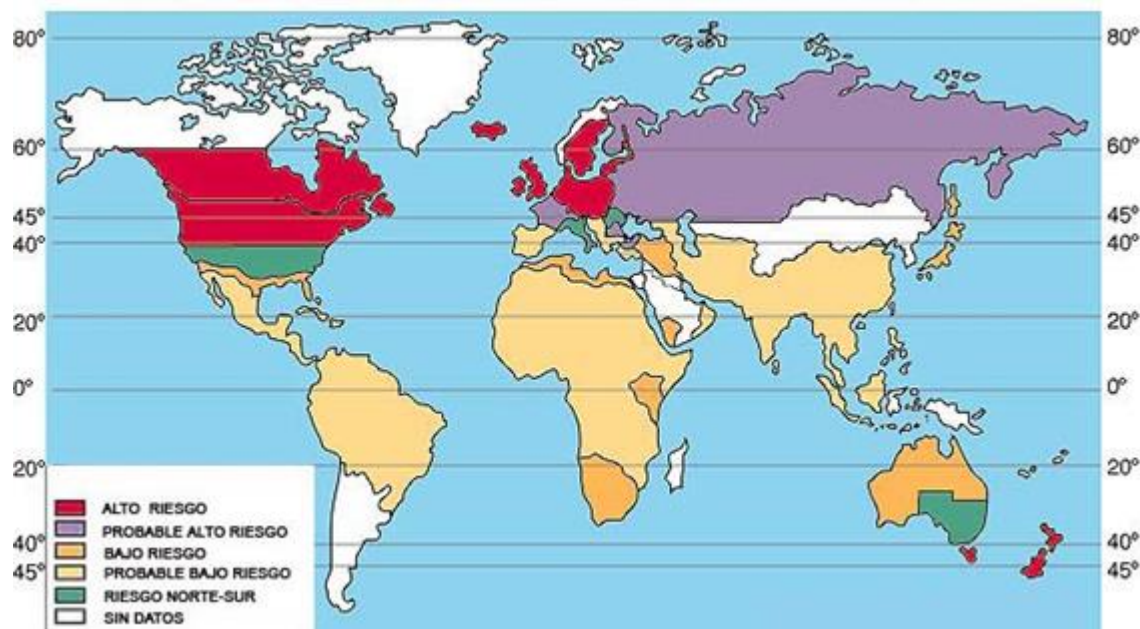


Figura 2: Distribución mundial del riesgo de padecer EM.

Estudios retrospectivos proponen que el tabaquismo es otro factor asociado con la susceptibilidad a padecer la EM. Así, Mikaeloff (2007), Hedström y Di Paulli (2011) relacionan el consumo de tabaco con el riesgo a desarrollar la EM y ponen de manifiesto que los niños de padres fumadores tienen un mayor riesgo. Por otro lado, Koch (2007) y Pittas (2009) relacionan el tabaco con un aumento en la gravedad de los brotes en la EM (Koch y col., 2007, Mikaeloff y col., 2007, Pittas y col., 2009, Lauer, 2010, Hedström y col., 2011, Wingerchuk, 2012).

1.5. MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Como se ha expuesto anteriormente, la EM es una enfermedad de la que se desconocen los factores que la desencadenan, así como los mecanismos moleculares y celulares implicados en su desarrollo. Para su comprensión y para poder diseñar terapias efectivas, se realizan estudios tanto en muestras procedentes de pacientes como en modelos experimentales. Los modelos que se han desarrollado hasta la fecha incluyen estudios en cultivos celulares y modelos animales.

Según las distintas hipótesis sobre el origen de la EM, se han desarrollado varios modelos animales. Partiendo de la hipótesis de la infección vírica, se han desarrollado modelos de encefalomiелitis utilizando el virus de la hepatitis murina, el virus distemper canino (moquillo canino) y la encefalomiелitis murina inducida por el virus de Theiler (TMEV), que es el modelo más utilizado por los investigadores. Los modelos generados por infecciones víricas comparten con la EM el proceso de desmielinización.

Por otra parte, considerando la hipótesis de autoinmunidad, se han desarrollado modelos como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). En este modelo, animales genéticamente susceptibles son inmunizados utilizando proteína básica de mielina, un homogenado de médula espinal de cobayo, membranas de oligodendrocitos o proteína proteolipídica. La EAE y la EM comparten una infiltración del SNC por células T autorreactivas y macrófagos así como desmielinización con distintos grados de daño axonal y neuronal (Martin y McFarland, 1995, Ferguson y col., 1997, 't Hart y col., 2009). Dentro de la EAE, se han conseguido modelos que se ajustan a las formas agudas de la enfermedad, como la EAE-aguda, y otras que se ajustan a formas crónicas de la misma, como es la EAE crónica recidivante (EAE-CR), en la que se observan diferentes episodios con déficits motores y cognitivos a lo largo del tiempo.

Desde un punto de vista de alteraciones genéticas, se han desarrollado modelos animales con ratones transgénicos pertenecientes a la cepa de ratones C57BL/6 deficitarios en los genes que codifican los complejos mayores de histocompatibilidad.

1.6. PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los estudios en pacientes con EM han mostrado que se trata de una enfermedad muy heterogénea, con una clínica y patogenia variables, siendo las formas progresivas de la enfermedad mucho más complejas que las agudas.

A pesar de las investigaciones realizadas hasta el momento, la etiopatogenia precisa de la EM se desconoce. En un principio, se consideraba la EM como una enfermedad autoinmune en la que existe una disregulación del sistema inmunológico (SI) que ataca al SNC (Martin y McFarland, 1995). Estudios en esta dirección afirman que se trata de un proceso patológico en el que están implicadas las células T autorreactivas, células B y células gliales que desencadenan un ataque humoral y celular contra el SNC, los oligodendrocitos (mielina) y los cuerpos neuronales de la sustancia

gris (Lopez-Diego y Weiner, 2008). No obstante, se ha observado que ciertos signos clínicos no pueden ser explicados únicamente por alteraciones a nivel inmunológico, por lo que deben existir otros factores involucrados en la neurodegeneración, el daño de la mielina y la excitotoxicidad asociada a la enfermedad. Por ello, se considera la EM como una enfermedad bifásica, diferenciándose una **fase inmunológica** y otra **degenerativa progresiva** en la que el estrés oxidativo juega un papel importante (Steinman, 2001, Mao y Reddy, 2010).

1.6.1. Fase inmunológica de la EM

1.6.1.1. Sistema inmune

El sistema inmunológico es el encargado de proteger al organismo frente a agresiones internas y externas. La respuesta inmunológica ante una agresión puede ser innata o adaptativa.

La **respuesta inmune innata** es la primera línea de defensa, capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, actúa de manera inmediata y no requiere un aprendizaje previo. En esta respuesta, intervienen diferentes moléculas, como el complemento, citoquinas (entre las que destacan la IL-1, IL-6, IL-7 o la IL-15), así como un conjunto de células entre las que destacan los monocitos, las células dendríticas (CD), los neutrófilos y las células *natural killer* (NK) o células asesinas naturales. La **respuesta inmune adaptativa** es la que se desarrolla específicamente frente a sustancias extrañas que no han sido eliminadas previamente por la respuesta inmune innata. Existen dos modalidades, una de tipo celular en la que participan los linfocitos T, y otro de tipo humoral en la que intervienen, como pieza central, los linfocitos B, que se caracterizan por producir inmunoglobulinas.

1.6.1.1.1. Componentes celulares del sistema inmune

Los componentes celulares del sistema inmune son los linfocitos, que se agrupan en linfocitos T, linfocitos B y células NK, y las células mieloides, que constituyen un grupo heterogéneo de células entre las que se incluyen los monocitos/macrófagos y las CD.

Los linfocitos son células efectoras que participan en la respuesta inmunológica adquirida pero que necesitan de la colaboración de células presentadoras de antígeno

(APC) para su activación y regulación. Estas APC, que contribuyen a la respuesta inmunológica innata, entran en contacto con el antígeno, lo procesan y lo presentan a los linfocitos.

Los linfocitos T, cuya identidad viene definida por la expresión clonal en su membrana citoplasmática de receptores específicos (TCR), se caracterizan por reconocer antígenos asociados a moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) expresadas por las APC. Tras el reconocimiento antigénico, se produce la activación de los linfocitos y su transformación en célula efectora. Los linfocitos pueden ser colaboradores (T_h), citotóxicos (T_c) o reguladores (T_{reg}). Las células T_h activan a otros tipos celulares como son los linfocitos B y los macrófagos. Las células T_c poseen capacidad citotóxica por lo que son capaces de destruir mientras que las células T_{reg} tienen como función principal la regulación de la actividad y función de los linfocitos, por lo que tienen gran importancia en los procesos de tolerancia.

Los linfocitos B se caracterizan por la expresión en membrana del receptor de células B (BCR) cuyo componente principal son las inmunoglobulinas (Igs) que funcionan como receptores antigénicos. El reconocimiento del antígeno por la Ig desencadena la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B hasta formar células memoria y células plasmáticas productoras de Igs. Además de su función efectora, los linfocitos B también actúan como APC, activando a los linfocitos T y capacitándolos para desarrollar sus funciones de reconocimiento y eliminación de antígenos.

Las células NK son células morfológicamente grandes con abundantes gránulos que contienen sustancias citotóxicas, carecen de receptores específicos de antígenos y forman parte del sistema inmune innato. Tienen una alta capacidad destructora que puede ser directa (citotoxicidad celular directa) o bien mediada por anticuerpos (ADCC).

Los monocitos son células grandes que se encuentran circulando en la sangre y expresan CD14 en su membrana. Son una población heterogénea de células capaces de extravasarse a los tejidos, dando lugar a células especializadas (monocitos residentes), o de migrar a tejidos inflamados. Cuando entran en los tejidos, sufren modificaciones estructurales que conllevan un aumento de tamaño así como una capacidad fagocítica, por lo que reciben el nombre genérico de macrófagos, aunque se denominan de

diferente manera en función del tejido en el que se localizan; por ejemplo, en el SNC reciben el nombre de célula microglial. Su función principal es la de fagocitar cuerpos extraños, aunque también son capaces de actuar como células APC y producir citoquinas proinflamatorias.

Las células dendríticas (CD) son células APC esenciales para la coordinación entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Estas células son capaces de transportar antígenos desde los tejidos hasta los ganglios linfáticos. Hay dos categorías de células CD según su origen y su función: CD mieloides y las CD plasmocitoides.

En la superficie de todas estas células, se expresan moléculas de diferente estructura y función que pueden ser empleadas para su caracterización fenotípica por medio de marcajes con anticuerpos monoclonales. Estos antígenos de superficie son moléculas que pueden tener una amplia distribución y ser expresadas en otras estirpes celulares, o bien pueden estar limitadas a los linfocitos T o incluso a determinadas subpoblaciones linfocitarias. A cada conjunto de anticuerpos que reconocen una proteína o “marcador” y que identifican un subconjunto particular, una determinada función o un estadio de diferenciación, se les designa “CD” (Cluster of Differentiation). Así, los linfocitos Th son, fenotípicamente, $CD3^+CD4^+$, las células Tc son $CD3^+CD8^+$, mientras que las células T_{reg} presentan diferentes fenotipos, siendo el más común $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Las células NK se definen como $CD3^-CD56^+CD16^+$.

1.6.1.1.2. Componentes moleculares del sistema inmune

La comunicación entre los componentes del sistema inmune se establece mediante contactos intercelulares y moléculas solubles secretadas tanto por las células efectoras como por las APC. El componente molecular del sistema inmune lo forma el sistema del complemento, las Igs, las citoquinas y las quimioquinas (Nossal, 1987).

Las citoquinas son mediadores solubles no específicos de antígeno, liberados principalmente por leucocitos y constituyen una vía esencial de interacción entre el sistema inmune y el resto del organismo. Las citoquinas participan en todas las facetas de la inmunidad incluyendo la presentación antigénica, reclutamiento, diferenciación, adhesión e inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular.

Dentro de los linfocitos T, los principales productores de citoquinas son los linfocitos Th. En función de las citoquinas que secretan, se clasifican en varios subtipos:

linfocitos Th1, que promueven la respuesta celular por la secreción de interferón- γ (IFN- γ), IL-2 e IL-12, por lo que tienen carácter proinflamatorio, los Th2, que promueven la respuesta humoral mediada por IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, lo que les confiere un carácter antiinflamatorio, los Th9, que también tienen un efecto antiinflamatorio y se caracterizan por secretar IL-9 y, por último, los linfocitos Th17, que producen IL-17 y tienen un carácter proinflamatorio.

Tabla 1: Resumen de tipos de linfocitos Th.

Tipo celular	Citoquinas	Carácter
Th1	IFN- γ IL-2 IL-12	Proinflamatorio
Th2	IL-4 IL-5 IL-6 IL-10	Antiinflamatorio
Th9	IL-9	Antiinflamatorio
Th17	IL-17	Proinflamatorio

Las quimioquinas constituyen una amplia familia de moléculas con capacidad quimiotáctica implicadas en el tráfico linfocitario y el reclutamiento de linfocitos a los focos inflamatorios e infecciosos. La migración celular a su lugar de destino requiere la expresión secuencial de varios quimiorreceptores en respuesta a diferentes gradientes de quimioquinas. Durante la respuesta inmune, tanto las APC como los monocitos, CD, células B y los linfocitos T expresan un patrón secuencial de quimiorreceptores que guían su extravasación (Parkin y Cohen, 2001).

El sistema del complemento agrupa un gran número de proteínas plasmáticas que reaccionan en cascada e interaccionan con complejos antígeno/anticuerpo y receptores de superficie. Algunos componentes del complemento tienen actividad quimiotáctica y provocan una respuesta inflamatoria local que favorece el reclutamiento y recirculación de APC. Los componentes finales de la cascada del complemento forman poros en la membrana del agente patógeno, originando su lisis directa (Medzhitov y Janeway, 2000).

1.6.1.2. Implicación del sistema inmune en la EM

En la EM, se han encontrado APC reactivas ante la proteína proteolipídica (PLP), glicoproteína de oligodendrocito (MOG), glicoproteína asociada a mielina (GAM) y proteína básica de mielina (PBM) (Huang y Rae-Grant, 2009). No se conocen bien los mecanismos que disparan la activación de los linfocitos y su migración masiva al SNC, pero se han propuesto dos posibles vías para su activación. Por un lado, se piensa que los antígenos son fagocitados por las APC en el SNC y éstas los transportan hasta los ganglios linfáticos, donde los presentan a los linfocitos para activarlos. Por otro lado, se cree que los antígenos son transportados pasivamente por la linfa a los ganglios linfáticos, donde serían fagocitados por las APC y presentados a los linfocitos (Frieze y Fugger, 2005, Frieze y col., 2005).

A pesar de no conocerse el mecanismo concreto, se propone que las APC captan los antígenos, los procesan en su interior y los presentan junto con las MHC a los linfocitos T $CD3^+$, que los reconocen gracias a sus TCR. La activación de los linfocitos requiere varias señales, además de la presentación del antígeno por parte de las APC, como la interacción con moléculas de adhesión celular y la interacción con moléculas co-estimuladoras como son las CD80, CD86 y CD28 (Gutcher y Becher, 2007).

En función del tipo de MHC que expresen las APC, se activarán distintos tipos celulares. Las MHC de tipo II (MHC-II) activan a linfocitos T $CD4^+$ inactivos, los cuales se diferencian en distintos subtipos celulares en función de las citoquinas que se encuentren en el medio. Las principales responsables de la secreción de las citoquinas que intervienen en la diferenciación son las células APC (Gutcher y Becher, 2007, Zhu y Paul, 2010, Chastain y col., 2011). Si en el medio hay IL-12 e IFN- γ , las células T $CD4^+$ se diferencian a Th1, mientras que si hay IL-2, IL-4, IL-10, se diferencian a Th2. En presencia de IL-4 y TGF- β , se diferencian a Th9 mientras que con IL-6, IL-23 y TGF- β , se diferencian a Th17. Por último, las células Th, en presencia de TGF- β e IL-2, se diferencian a células T reguladoras (T_{reg}) que, a su vez, proceden a activar otros tipos celulares en sangre periférica (**Figura 3**).

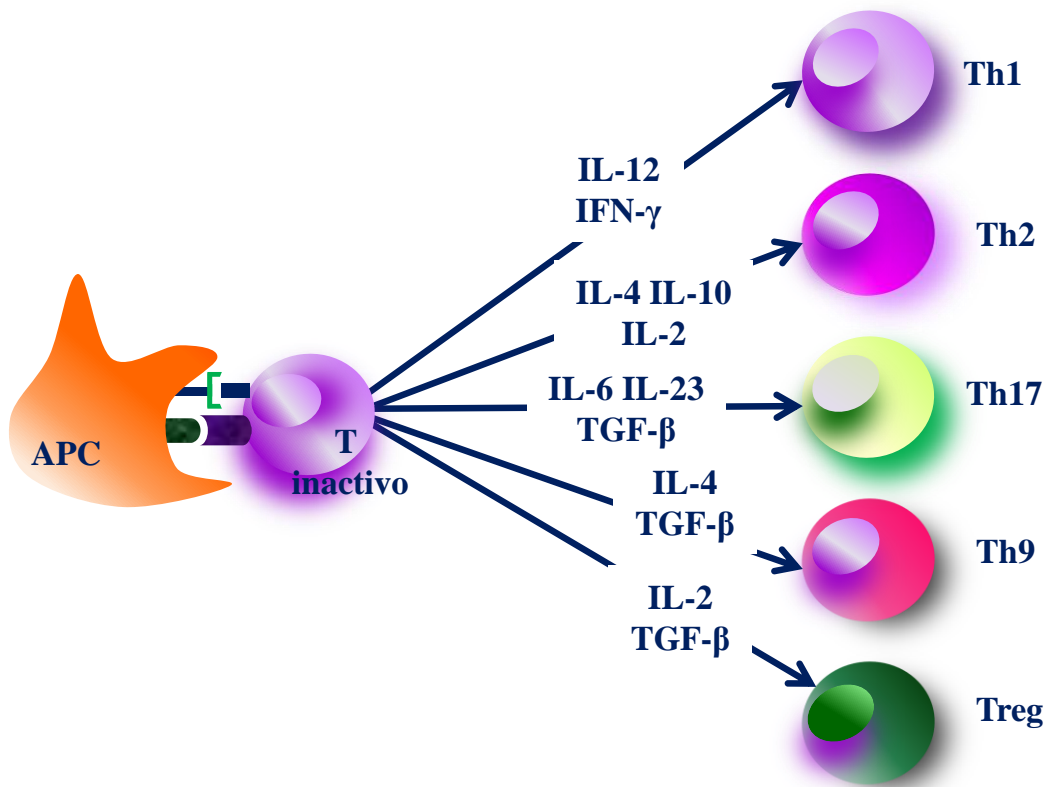


Figura 3: Activación de las células T y diferenciación de células Th en función de las citoquinas del medio.

Tras diferenciarse, los linfocitos se dirigen a la barrera hematoencefálica (BHE), atravesándola mediante un proceso de trans migración mediado por proteínas de adhesión celular. Estudios en lesiones activas de pacientes con EM y en modelos de EAE han demostrado un aumento de la expresión de ICAM-1, VCAM-1, E y P-selectinas en el epitelio de la BHE. Estas moléculas contribuyen a la migración de los linfocitos, además de actuar como co-estimuladoras de las células T activas (Bar-Or y col., 1999). Los linfocitos, por su parte, expresan los receptores LFA-1 (para ICAM-1) y VLA-4 (para VCAM-1). También se ha observado un aumento de la expresión de las citoquinas CCL19 y CCL21 así como un aumento en los niveles de los receptores de citoquinas CCR7 en pacientes con EM y en ratas con EAE (Engelhardt, 2006). Se ha postulado que el proceso de migración ocurre en dos fases: en la primera fase, sólo participan células de la BHE y células T activas, que atraviesan la barrera sin dañarla (Carman y Springer, 2004, Sanders y De Keyser, 2007) mientras que en la segunda fase, se ha observado un deterioro de la integridad de la BHE (Sanders y De Keyser, 2007),

que podría ser consecuencia de la secreción, por las células Th1, de metaloproteasas de matriz (MMP), especialmente las MMP-2 y las MMP-9, o de la secreción de IL-17 secretada por las células Th17. Dicha secreción conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa en el epitelio de la BHE, produciéndose así una rotura y regulación a la baja de moléculas de unión celular, como son las ocludinas, y produciendo un aumento de los mecanismos de contracción celular (Huppert y col., 2010). El resultado es una BHE frágil que permite el paso indiscriminado de linfocitos al SNC. Estas alteraciones se han observado tanto en la EM como en la EAE (**Figura 4**).

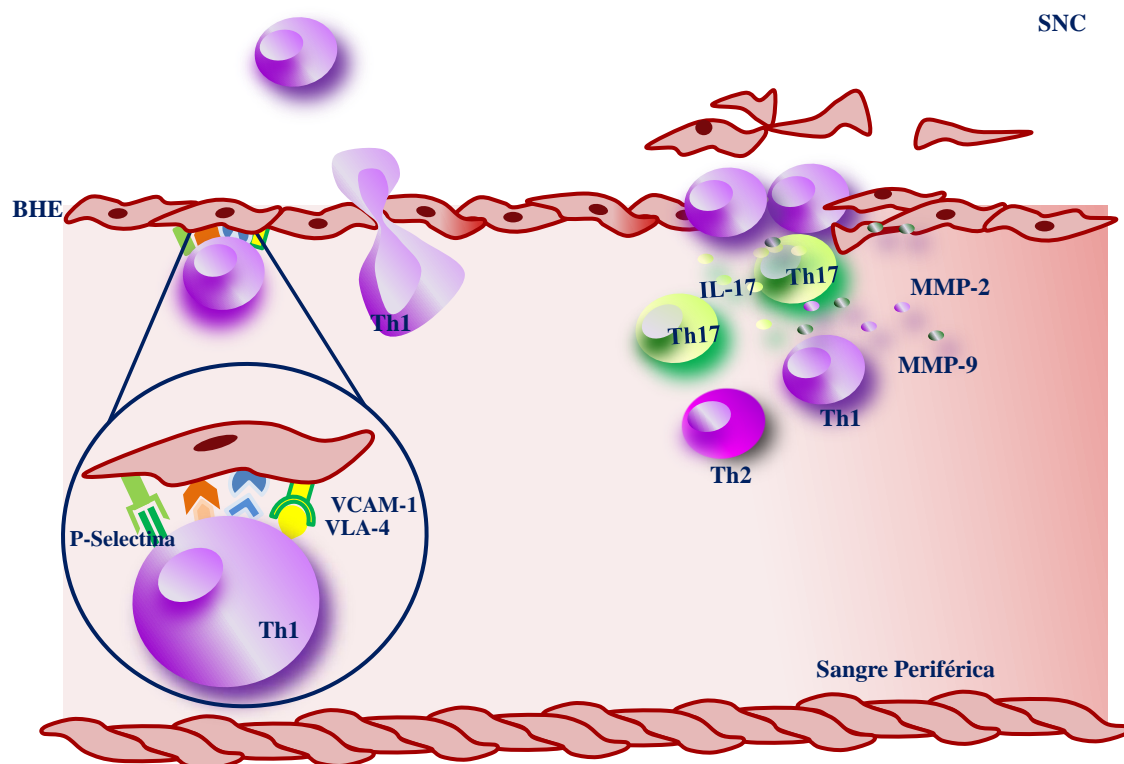


Figura 4: Mecanismo de extravasación de linfocitos en la barrera hematoencefálica (BHE).

Una vez en el SNC, las células Th1 secretan IL-1, TNF- α , e IFN- γ , que producen un reclutamiento y activación de macrófagos, microglía y una expansión clonal de los linfocitos Th1. Asimismo, las células Th1 activan las células B, gracias a la secreción de

IFN- γ y TNF- α , que se diferencian en células plasmáticas. A su vez, las células Th1 pueden adquirir actividad citotóxica por la acción de las mismas citoquinas.

Las células Th2, tras migrar al SNC, juegan un papel dual. Por un lado, en las fases agudas de la enfermedad, son capaces de producir citoquinas que activan a las células B, las cuales producen anticuerpos contra la mielina. Por otro lado, pueden ejercer un papel antiinflamatorio en las fases de recuperación mediante la producción de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-10 (Dhib-Jalbut, 2002). Así, ciertos tratamientos en modelos experimentales dirigidos a la activación de las células Th2 mejoran los signos clínicos de la enfermedad (Farina y col., 2005, Huang y Rae-Grant, 2009). El balance entre las poblaciones de células Th1/Th2 es el que polariza la respuesta inmunológica en la EM y en la EAE. Los niveles de ambas poblaciones están regulados por las citoquinas que se encuentran en el medio, que son producidas por diferentes tipos celulares como los macrófagos, la microglía y las APC (Jäger y col., 2009, Zhou y col., 2011).

Las células Th17 realizan su acción en el SNC mediante la secreción de IL-17. Esta interleuquina contribuye a la rotura de la BHE, estimula localmente la producción de IL-6, óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂) y tiene un efecto sinérgico junto con la IL-1 β , el TNF- α , el IFN- γ y el ligando CD40, permitiendo el aumento de la expresión de genes inflamatorios y amplificando la inflamación local, además de reclutar macrófagos y monocitos (Afzali y col., 2007).

Las células T CD8⁺, tras activarse, migran desde los ganglios linfáticos al SNC (Calzascia y col., 2005, Friesse y Fugger, 2005, Mars y col., 2011). Su activación requiere las MHC-I, junto con la co-activación de CD28-B7 y la presencia de ciertas citoquinas. En la EM y en la EAE, los astrocitos, la microglía, los oligodendrocitos y las neuronas son capaces de expresar MHC-I bajo condiciones de inflamación, convirtiéndose en potenciales activadores de las células T CD8⁺. El aumento de las MHC-I se observa durante el curso temprano, antes de la desmielinización. En función de las citoquinas del medio, se producen células T CD8⁺ específicas de antígeno, que ejercen un daño directo sobre oligodendrocitos y neuronas, y células T CD8⁺ reguladoras, que tienen una función específica regulando la inflamación del SNC y promoviendo la remisión de los síntomas (Johnson y col., 2007). En los periodos de exacerbación de la enfermedad, los niveles de células T CD8⁺ efectoras se encuentran

elevadas en parénquima y en el LCR, siendo responsables, en parte, del daño axonal y de la desmielinización, ya sea mediante la producción de TNF- α e IFN- γ o mediante una acción citotóxica directa, ya que secretan FasL, perforinas y granzimas (Gibbins y Befus, 2009). Además, recientemente, se han identificado células T CD8⁺ que secretan IL-17 (Saxena y col., 2011). Estudios *post-mórtem* de pacientes con EM aguda y crónica han detectado células T CD8⁺ en lesiones dentro del parénquima cerebral. Por lo tanto, existe una correlación entre la abundancia de células T CD8⁺ y la intensidad del daño axonal (Bitsch y col., 2000, Saxena y col., 2011). Se ha encontrado que los niveles de T CD8⁺ reguladoras están disminuidos durante los periodos de exacerbación de la enfermedad en comparación tanto con los periodos de remisión como con individuos controles. Es en periodos de recuperación cuando los niveles de las células reguladoras están más elevados (Cohen y col., 2004, Correale y Villa, 2008, Saxena y col., 2011). Las T CD8⁺ reguladoras realizan su acción controlando las células T CD4⁺ efectoras mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias, como son la IL-10 y TGF- β .

El mantenimiento de la activación de las células T en el parénquima cerebral requiere señales de estímulo tanto de las APC, que pueden expresar en la misma célula MHC I y II, debido un mecanismo de presentación cruzada de antígenos (Friesen y Fugger, 2005), como de las CD, las cuales en las primeras etapas de la enfermedad secretan IL-27 para la activación de Th1 (Fitzgerald y col., 2007) y posteriormente promueven la maduración y expresión de MHC-II y de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) (Serafini y col., 2000, Chastain y col., 2011, Mohammad y col., 2012). En pacientes con EM, se ha visto que estos tipos celulares se infiltran en las leptomeninges, los plexos coroideos y la duramadre (Fischer y Reichmann, 2001, Pashenkov y col., 2002, Kivisäkk y col., 2004). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que en la EAE, las CD plasmocitoides (CD11c^{int}, B220) podrían tener un papel beneficioso en la enfermedad al ser capaces de producir interferón, que contribuye a la diferenciación de células T_{reg} (Mohammad y col., 2012).

Los macrófagos activos son capaces de atravesar la BHE. Si bien su mecanismo no se conoce bien, se sabe que el paso está mediado por moléculas de adhesión celular expresadas por los macrófagos (β 2-integrina MAC-1 (CD11b/CD18) y LFA) y por el endotelio (ICAM-1). Los macrófagos, una vez extravasados desde la sangre periférica al parénquima cerebral, pueden transformarse gradualmente en microglía (Raivich y

Banati, 2004). Así, estudios tanto en pacientes con EM como en la EAE, han detectado macrófagos y microglía activos en parénquima cerebral (Benveniste, 1997, Minagar y col., 2002, Napoli y Neumann, 2010). Se desconoce si la activación de la microglía es el resultado del daño neuronal causado por otras células o si su activación es la responsable de la destrucción y, por consiguiente, la activación y extravasación de los linfocitos (Sanders y De Keyser, 2007). Existe un amplio rango de citoquinas que activan a la microglía, tales como IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α , linfotoxina (LT), proteína inflamatoria de macrófagos 1- α (PIM1- α) y TGF- β , que se encuentran elevadas en la EM así como en la EAE (Benveniste, 1997).

La microglía podría desempeñar diferentes funciones en el desarrollo de la EM y la EAE. Por un lado, podría tener una función similar a las células APC y ser capaz de activar a las células T inactivas, desempeñando un papel clave para la progresión de la EM. Por otro lado, podría jugar un papel directo en la muerte de oligodendrocitos y neuronas o podría actuar de forma beneficiosa por su función fagocítica (Mc Farland y Martín 2007; Korn T. 2008). La activación de la microglía promueve la producción de moléculas de superficie celular como son las MHC-I y las MHC-II, así como moléculas co-estimuladoras tales como B7-1, B7-2 y CD40 y la secreción de citoquinas y quimioquinas. Por acción del IFN- γ , estas células expresan MHC-II para reactivar a los linfocitos Th y MHC-I y, así, activar a los linfocitos Tc (Saxena y col., 2011). Además, la IL-12 producida por los macrófagos mantiene y reactiva la respuesta inmune, induciendo la diferenciación de células T CD3⁺ inactivas a Th1. Por otro lado, los macrófagos y la microglía, mediante la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1, inducen astrogliosis. Asimismo, la activación de diferentes componentes del complemento, la secreción de NO, ERO, de MMP2 y MMP9 y de TNF- α provocan un daño directo en los oligodendrocitos y las neuronas. Además, el TNF- α produce una disregulación en los niveles de glutamato que provoca neurotoxicidad (Benveniste, 1997, Minagar y col., 2002, Takeuchi y col., 2006). En los periodos de recuperación de la enfermedad, la microglía puede adoptar un fenotipo fagocítico (Sanders y De Keyser, 2007, Chastain y col., 2011) en el que segrega citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β , lo que induce la diferenciación de las células a Th2 (Sanders y De Keyser, 2007, Cao y He, 2013) y promueve la oligodendrogénesis por la secreción de IGF-1 y DPGF- α (Napoli y Neumann, 2010, Cao y He, 2013).

Los astrocitos son las células más abundantes en el SNC y están involucradas en mantener la integridad de la BHE, estabilizar las concentraciones extracelulares de calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+), metabolizar el glutamato y producir los factores de supervivencia trófica de las neuronas y de la glía. En la EM y en la EAE, los astrocitos pueden contribuir a la presentación de antígenos a las células T y B mediante la expresión de MHC (Fontana y col., 1984), así como la secreción de las citoquinas IL-12, IL-23, IL-6 y TGF- β , que facilitan la reactivación de los linfocitos y permiten la diferenciación de linfocitos T. Asimismo, los astrocitos secretan factores estimuladores de colonias (CSF) que contribuyen al mantenimiento y crecimiento de los macrófagos y la microglía (Minagar y col., 2002, Chastain y col., 2011). Por acción del IFN- γ y del TNF- α , los astrocitos aumentan la expresión de ICAM-1, VCAM1 y E-selectinas, facilitando así el reclutamiento de linfocitos en el modelo de EM producido por infección viral. Además, los astrocitos, por acción de la IL-17, son capaces de secretar CCL2, CCL12, CXCL1 lo que fomenta, aún más, el reclutamiento de células T y macrófagos (Chastain y col., 2011). En la EM y EAE, alrededor de las placas inflamatorias, se observa astrogliosis, que se caracteriza principalmente por proliferación de astrocitos, hipertrofia e incremento de la síntesis de la proteína ácida fibrilar (GFAP) y la proteína específica de astrocitos (Benveniste 1996).

Se ha postulado que en las zonas lesionadas, el balance entre macrófagos y astrocitos influye en los niveles de Th1/Th2 y viceversa. Las Th1 estimulan a los macrófagos a producir PGE2, la cual a través de un mecanismo de retroalimentación negativa es capaz de inhibir la actividad de las Th1. Por otro lado, los macrófagos y las Th1 son capaces de producir IFN- γ , que estimula la producción de PGE2 por los astrocitos, participando así en el control de la actividad de los macrófagos y de las Th1.

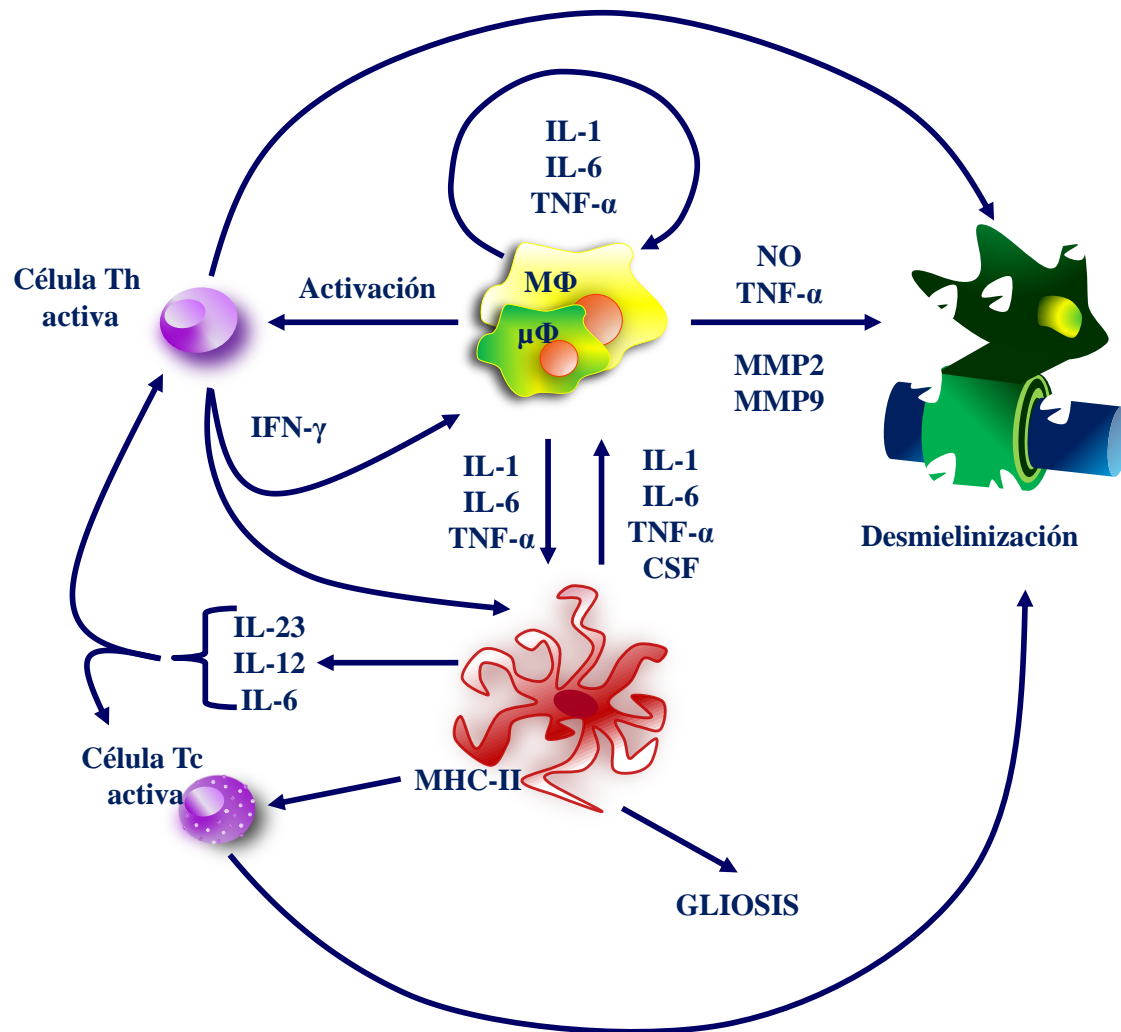


Figura 5: Esquema de la posible interacción entre los componentes celulares y moleculares en la esclerosis múltiple.

Además de las evidencias inequívocas del papel de las células T en la patogenia de la EAE y de la EM, también hay evidencias del papel de las células B (células plasmáticas) y sus productos de secreción en el curso y desarrollo de dichas enfermedades (Cross y Waubant, 2011), sugiriendo que podrían estar involucradas en los fenotipos de la enfermedad así como en su gravedad (Svensson y col., 2002). En este sentido, las bandas oligoclonales de IgG en el LCR son utilizadas como marcadores de EM y para pronosticar la gravedad de la enfermedad (Reindl y col., 2010, Cross y Waubant, 2011, Disanto y col., 2012). La respuesta de las células B comienza, por un lado, en los ganglios linfáticos tras el reconocimiento del antígeno (Ag) por parte de sus receptores B (BCR) y, por otro lado, como resultado de la activación por parte de las

células Th1. Las células B activadas son capaces de atravesar la BHE ya que expresan en la superficie celular la subunidad α -4 del receptor VLA-4. El papel de las células B en la patogenia de la enfermedad no solo se debe a la producción de anticuerpos contra la PBM sino a su capacidad de producir citoquinas proinflamatorias, a la presentación de antígenos a células T, y a la activación de células T_{reg} (Liossis y Sfrikakis, 2008, 't Hart y col., 2009, 't Hart y Massacesi, 2009, Reindl y col., 2010). Por otro lado, las células B podrían tener un papel beneficioso en la EM dado que ciertos anticuerpos sirven para eliminar los restos de la mielina degradada que permanecen en el medio (Wootla y col., 2011).

Estudios recientes han demostrado que la EM se acompaña de una alteración de la maduración y función de las células T_{reg} (Zozulya y Wiendl, 2008). En los ganglios linfáticos, dichas células interactúan con las APC, modulando su interacción con las NK, controlan la maduración y el número de las NK, ejercen una supresión directa de los monocitos y de los macrófagos, e inducen apoptosis de las células B mediante granzimas y perforinas (Taams y col., 2005, Terme y col., 2008).

Se ha demostrado que las células NK son supresoras de la diferenciación de las células B y de la síntesis de anticuerpos, por lo que se postula que alteraciones en el número o en la función de estas células podría conllevar a una activación de las células B y la consiguiente producción de anticuerpos. En la EAE, se ha observado que las células NK ejercen un efecto citotóxico directo sobre las células T específicas de autoantígeno (Xu y col., 2005). No obstante, otros autores han demostrado un aumento de células NK reactivas contra la PBM en pacientes con EM (Filiaci y col., 1999), por lo que el verdadero papel que juegan las células NK en la patogenia de esta enfermedad no se ha esclarecido. En la EM, dicho papel podría ser dual. Por un lado, las NK son capaces de producir daño citotóxico directo mediante la secreción de IFN- γ y la activación de las células Th1 y CD y, por otro lado, tienen un papel protector al ser capaces de secretar IL-5 e IL-13 para activar a las células Th2. Mediante la IL-10, también son capaces de activar a células T_{reg}. Asimismo, las células NK podrían producir la muerte de células T activas contra la mielina y la lisis de células dendríticas (Morandi y col., 2008, Sakuishi y col., 2010).

Ciertos estudios consideran que la EM es una enfermedad en la que existe una deficiencia en células inmunológicas reguladoras. Así, las células NKT (un tipo de

células NK que presenta en su membrana ciertas moléculas propias de las células T) y las células T_{reg} ($CD4^+CD25^+$) se encuentran disminuidas en los periodos agudos de la enfermedad. El mecanismo por el cual las NKT podrían reducir la severidad de la enfermedad se debe a su capacidad para inducir la secreción de citoquinas antiinflamatorias por parte de las células Th2 (Araki y col., 2003, Correale y Villa, 2008).

1.6.2. Fase degenerativa progresiva

Como se ha comentado en el apartado anterior, la EM es una enfermedad bifásica, con un componente inmunológico y otro degenerativo progresivo (Liu y col., 2003, Gilgun-Sherki y col., 2004). Estudios recientes sugieren que el estrés oxidativo y la excitotoxicidad juegan un papel importante en el desarrollo y progresión de la EAE y de la EM, siendo los principales agentes involucrados en la fase degenerativa progresiva (Benveniste, 1997, Smith y McDonald, 1999). El estrés oxidativo surge al existir un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes del organismo. Algunos autores han demostrado que los oligodendrocitos y las neuronas del SNC son muy vulnerables a los radicales libres (Smith y McDonald, 1999, Hollensworth y col., 2000).

1.6.2.1. Estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas, se producen continuamente radicales libres debido al metabolismo. Los radicales libres pueden tener diversa procedencia, derivados del metabolismo del oxígeno, del nitrógeno, del azufre y del carbono.

Los radicales libres son especies altamente reactivas que se caracterizan por poseer en su orbital de valencia electrones desapareados susceptibles de reaccionar con moléculas o átomos (Cheeseman y Slater, 1993, Sies, 1993, Sayre y col., 2008). El proceso en el que intervienen los radicales libres consta de tres fases:

-Iniciación: fase en la que se generan los radicales libres. Dicha iniciación puede ocurrir cuando un enlace covalente se rompe al estar bajo condiciones extremas, como son temperaturas muy elevadas o radiaciones ionizantes. El resultado son dos radicales, cada uno con un electrón desapareado.



-Propagación: Comprende reacciones donde el número total de radicales no varía. En ellas, estas especies pueden donar electrones a una molécula estable (M), estabilizándose ellos mismos pero generando un nuevo radical libre. Estos radicales captan un electrón de terceras moléculas en una reacción en cadena. La fase de propagación tiene mucha importancia en sistemas biológicos ya que pueden alterar estructuras proteicas, lipídicas y ADN.



-Terminación: Pertenecen a esta etapa las reacciones en las que los radicales libres reaccionan entre sí dando lugar a moléculas estables.



Los radicales libres más abundantes y reactivos en los organismos aerobios son los que se agrupan bajo el término “especies reactivas del oxígeno” (ERO). En este término se engloban especies como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), así como moléculas derivadas de oxígeno e involucradas directamente en la producción de radicales como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso (HClO). En condiciones fisiológicas, estos radicales se generan por diversos mecanismos, tales como escape de electrones del citocromo P_{450} , autooxidación de hemoproteínas y catecolaminas, procesos de fagocitosis en respuestas inflamatorias y durante la fosforilación oxidativa.

El $O_2^{\cdot-}$ es un radical libre cargado con una vida media muy corta (milisegundos) que se forma cuando la molécula de oxígeno adquiere un electrón.



Este radical se produce en diversas reacciones fisiológicas del organismo, entre ellas, en la oxidación de xantina a ácido úrico por acción de la xantina oxidasa, la fosforilación oxidativa, reacción en la cual tanto la ubiquinona como la NADH deshidrogenasa son las principales responsables de su producción, y en las reacciones de autooxidación de quinonas reducidas, catecolaminas y tioles (McCord y Fridovich, 1969, Fridovich, 1976, Cheeseman y Slater, 1993).

El H_2O_2 es otro radical libre que tiene reactividad química limitada, pero tiene gran facilidad de reaccionar con iones metálicos de transición y de atravesar membranas lipídicas, por lo que es capaz de causar daño en macromoléculas lejos de su lugar de producción (Barlow y col., 1979). Entre las enzimas que lo producen se encuentran la D-aminoácido oxidasa, la monoamino oxidasa y la superóxido dismutasa (SOD).

El HO^\bullet es considerado uno de los radicales libres más peligrosos, ya que es capaz de reaccionar directamente con casi todas las moléculas biológicas, como lípidos de membrana, proteínas y ADN (Sayre y col., 2008). Presenta una toxicidad mucho mayor que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ o el H_2O_2 (Babior, 1997). En los organismos vivos, la principal fuente de producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ es la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales de transición como son el hierro y el cobre (Sullivan y col., 2004). Los metales libres en forma reducida (Fe^{2+} , Cu^+) pueden reaccionar con el H_2O_2 (que se produce por dismutación del superóxido) para generar el HO^\bullet y metales oxidados (Fe^{3+} , Cu^{2+}) (Benov, 2001, Sayre y col., 2008). Estas especies pueden ser reducidas de nuevo por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generando un ciclo de oxidación reducción conocido con el nombre de reacción de Fenton (Fenton y col., 1984). Si se considera este ciclo desde la formación del superóxido, se le denomina reacción de Haber-Weiss (Benov, 2001).



Como se ha comentado anteriormente, además de las ERO, existen especies reactivas derivadas del nitrógeno (ERN). El NO es una molécula producida por la óxido nítrico sintasa (NOS) en condiciones fisiológicas, tanto en neuronas, actuando como neurotransmisor, como en el endotelio. En situaciones de inflamación, la microglía activa genera grandes cantidades de NO que reacciona rápidamente con el radical superóxido, formando peroxinitrito (ONOO^-). Este radical libre es capaz de dañar

macromoléculas por procesos de oxidación y nitración que pueden inhibir canales de membrana, alterar la homeostasis del Ca^{2+} y dañar la mitocondria (Alvarez y Radi, 2003). Estudios recientes han mostrado que el radical peroxinitrito interviene en procesos inflamatorios en el SNC y que los oligodendrocitos son mucho más sensibles a este radical que al NO.

La producción de ERN y ERO también se debe a la excitotoxicidad mediada por el glutamato. El glutamato es un aminoácido excitador del SNC que, en condiciones fisiológicas, se secreta en procesos de aprendizaje y memoria. Realiza su función a través de receptores específicos, como receptores de N-metil-D-Aspartato (NMDA), causando una movilización de Ca^{2+} . Los astrocitos también secretan al espacio extracelular glutamato de manera dependiente de Ca^{2+} , modulando así la actividad eléctrica neuronal y la transmisión sináptica (concepto de sinapsis tripartita) (Ding, 2013). El efecto excitotóxico del glutamato se debe a la descompensación entre el efecto del glutamato y la disminución del efecto inhibitor de los receptores de GABA y de glicina. Por otro lado, el vínculo crítico entre la excitotoxicidad y la generación de ERO por parte del glutamato es la concentración de Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} provoca en la mitocondria su transporte al interior mitocondrial para mantener los niveles de Ca^{2+} bajos en el citoplasma, lo que conlleva daños a nivel de la mitocondria que implican disfunción o alteración en la cadena transportadora de electrones. El último complejo de la cadena, el complejo VI, es el que transfiere los electrones al O_2 , de modo que la mala recepción de los electrones por parte del O_2 conlleva a la producción de ERO. Por otro lado, al aumentar los niveles de Ca^{2+} , se produce una alteración de proteasas y nucleasas así como un aumento de los niveles de fosfolipasa A2 (PLA_2), enzima responsable de hidrolizar fosfolípidos de membrana, lo que conduce a una liberación de ácido araquidónico. Sobre éste último, puede actuar la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa, aumentando, a su vez, los niveles de ERO y ERN (Durán y col., 1984).

Las ERO y las ERN alteran proteínas (por la reacción de Fenton, se producen entrecruzamientos, agregación), ADN (produciendo mutaciones puntuales), y lípidos (peroxidación). La peroxidación lipídica es el proceso a través del cual los radicales libres capturan hidrógeno de los lípidos de las membranas celulares. Este proceso consta de tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación. En la fase de iniciación, un radical hidroxilo captura un hidrógeno de un ácido graso de la membrana,

lo que genera una molécula de agua y un radical lipídico. En la fase de propagación, el radical lipídico reacciona con oxígeno molecular, generándose un radical peróxido y esta reacción continúa dado que el nuevo ácido graso es altamente reactivo. La fase de terminación tiene lugar cuando dos radicales reaccionan entre sí. La peroxidación de lípidos ocurre principalmente en ácidos grasos polinsaturados (PUFA) debido a que contienen dobles enlaces. Esto conlleva a una desestabilización de los lípidos anexos y, con ello, una desestabilización de la membrana tanto celular como de los orgánulos en la que ocurre. La reacción de propagación por las membranas puede afectar también a componentes no lipídicos como proteínas (Greco y col., 2000, Montine y col., 2004, Olivera y col., 2007). El SNC es especialmente vulnerable a este daño oxidativo por su gran contenido en PUFA.

Para minimizar el efecto de las ERO como ERN, existen defensas enzimáticas y no enzimáticas que intervienen en la acción o formación de radicales libres. Éstas incluyen:

- Defensas antioxidantes enzimáticas: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutathion peroxidasa, glutathion reductasa, etc.
- Defensas antioxidantes no enzimáticas: ácido úrico, vitamina C, vitamina E, etc.

Las defensas enzimáticas son enzimas especializadas en metabolizar las ERO y transformarlas en especies no reactivas. La primera línea de defensa antioxidante es la SOD, que se encarga de catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a oxígeno molecular y H_2O_2 . Esta enzima se localiza principalmente en el citosol y en la mitocondria. Posteriormente, el H_2O_2 se descompone en agua y oxígeno por la acción de la enzima CAT y del sistema del glutathion. El glutathion es un tripéptido formado por glicina, cisteína y ácido glutámico que, en su forma reducida (GSH) y por acción de la glutathion peroxidasa (GPx), transforma el H_2O_2 en dos moléculas de agua, pasando así a la forma oxidada (GSSG).

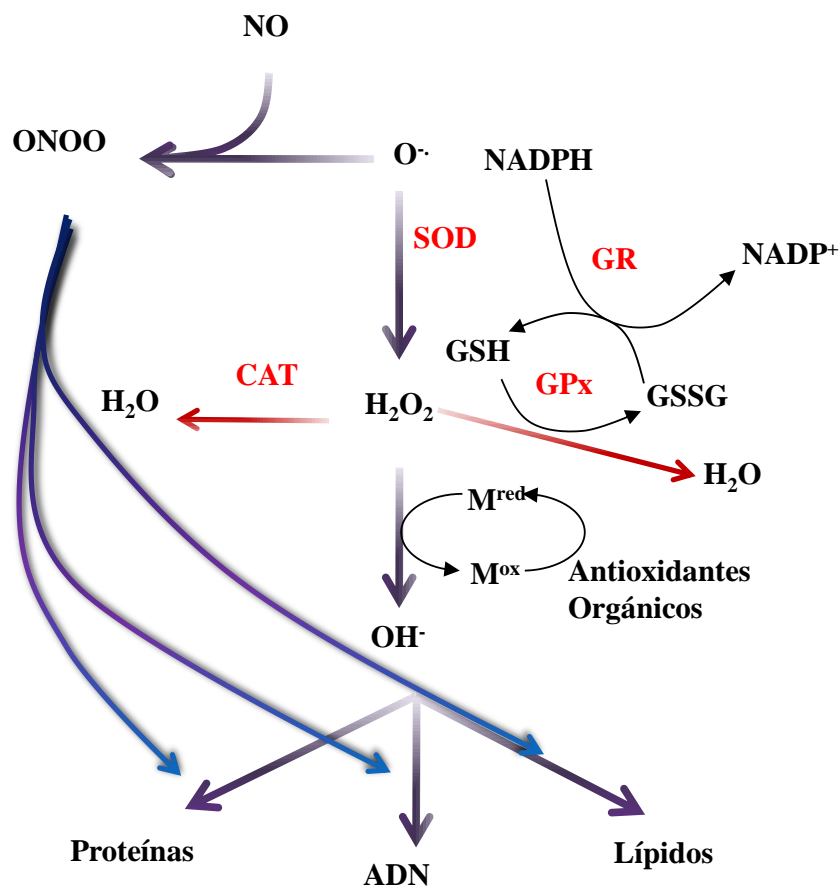


Figura 6: Cadena de oxidación y sistemas antioxidantes. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GPx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; M^{ox} : metales de transición oxidado; M^{red} : metales de transición reducido; NADP: nicotinamida adenin dinucleótido fosfato. Modificado de (Sayre y col., 2008).

1.6.2.2. Estrés oxidativo en la EM

En la fase degenerativa de la EM, se han encontrado niveles elevados de ERO y ERN. Estos radicales libres son producidos principalmente por macrófagos, microglía, células T CD8⁺ y astrocitos. En lesiones de la sustancia blanca, tanto en la EM como en la EAE, se ha observado daño oxidativo en lípidos de membrana, proteínas y DNA (Kuhlmann y col., 2002). También se ha observado que, en placas inflamatorias activas de la EAE, la microglía y los astrocitos aumentan los niveles de glutamato extracelular provocando, en neuronas y oligodendrocitos, una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , lo que contribuye al aumento del estrés oxidativo (Toshniwal y Zarling, 1992, Vladimirova y col., 1998, Lu y col., 2000). Por otro lado, se han encontrado niveles altos de glutamato en el LCR.

En estudios *post-mórtem* de pacientes con EM aguda o crónica, las lesiones de la sustancia blanca muestran una elevación de la enzima NOS inducible (NOSi) y, por consiguiente, de los niveles de NO y de ONOO⁻. (Cross y col., 1998, Oleszak y col., 1998, Liu y col., 2001, Jack y col., 2007). Se ha postulado que en los oligodendrocitos, el NO produce muerte por necrosis, además de un bloqueo reversible de la conducción axonal e inhibición de la respiración mitocondrial, lo que provoca degeneración axonal (Greenstein, 2007). En lesiones desmielinizantes de la sustancia blanca, la NOSi puede inducir la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), lo que inicia la reacción y síntesis de PGE₂, PGD₂, PGF₂ y tromboxanos, fomentando así la producción de EROs y provocando citotoxicidad y muerte celular de oligodendrocitos y neuronas (Carlson y col., 2010, Palumbo y col., 2012). Recientemente, se ha sugerido que la COX-2 y el NO podrían tener un efecto sinérgico, aumentando el daño celular vía la excitotoxicidad mediada por glutamato (Palumbo y col., 2012, Palumbo y Bosetti, 2013). Por otro lado, en macrófagos activos aislados de las placas inflamatorias de la EM, se ha observado un aumento de la expresión de COX-2 y de NOSi así como de la 5-lipoxantina (una enzima clave en la biosíntesis de leucotrienos) (Rose y col., 2004). Estos resultados permitieron el diseño de un modelo de desmielinización causado por la acción sinérgica del NO y COX-2 (Rose y col., 2004). En este modelo, la microglía es el auténtico causante de la inflamación y, por lo tanto, de la desmielinización (Rose y col., 2004). Por consiguiente, diversos estudios se han encaminado a inhibir la NOSi, obteniendo resultados muy prometedores pues se ha demostrado que su inhibición reduce la severidad de la inflamación en la EAE (Rose y col., 2004, Sanders y De Keyser, 2007).

Los principales productos de la microglía que parecen tener un efecto directo en la muerte neuronal son el glutamato y el NO. La secreción de NO y de glutamato por la microglía parece estar bajo control, por un lado, del IFN- γ (principalmente producido por las células Th1 aunque también por la microglía tras su activación), y por otro lado, bajo el control del TNF- α , cuyo principal productor es la propia microglía. Así, la microglía, una vez activada, es capaz de inducir un incremento en la producción de glutamato y NO, lo que produce el ambiente adecuado para la muerte neuronal.

Por otro lado, la microglía tiene un efecto positivo en la EM por su función fagocítica, que parece ser la responsable de eliminar las células T apoptóticas terminando así la reacción inflamatoria (Sanders y De Keyser, 2007).

En las lesiones activas crónicas de la EM, la actividad del complejo I de la cadena transportadora de electrones está reducido (Lu y col., 2000). Además, se ha observado que en las zonas de corteza que no están afectadas, hay una disminución de la actividad de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, lo suficiente como para producir una disminución de los niveles de ATP (Dutta y col., 2006). El daño oxidativo en el ADN mitocondrial podría contribuir a la disminución del metabolismo energético.

Además de la pérdida axonal y la desmielinización, la remielinización también está alterada en la EM (Franklin, 2002). Estudios de Foote y Blakemore han demostrado que las células precursoras de oligodendrocitos (CPO) se encuentran en las placas de lesiones agudas de EM, aunque la tasa de remielinización es muy baja. Estos mismos autores, utilizando modelos experimentales, consideran que el déficit en la remielinización es causada por alteraciones en las células CPO (Foote y Blakemore, 2005). Dichos autores han determinado que la acción de las CPO es inducida por la microglía y las células T al secretar IL-1 β , TGF- β 1, FGF-2, PDGF-AA y TNF- α vía TNFR2. No obstante, este mecanismo no se conoce bien y es posible que la microglía actúe negativamente frente a los CPO (Franklin, 2002, Foote y Blakemore, 2005).

Dada la desmielinización en la EM, se han buscado biomarcadores de daño axonal que sirvan para monitorizar tanto el desarrollo como la gravedad de la enfermedad. Se han medido las proteínas axonales del citoesqueleto en el LCR de pacientes con EM, tanto en periodos de remisión como en las recidivas de la enfermedad. Así, se ha observado un aumento de los niveles de neurofilamentos H y L en las formas progresivas de la enfermedad (Teunissen y col., 2005).

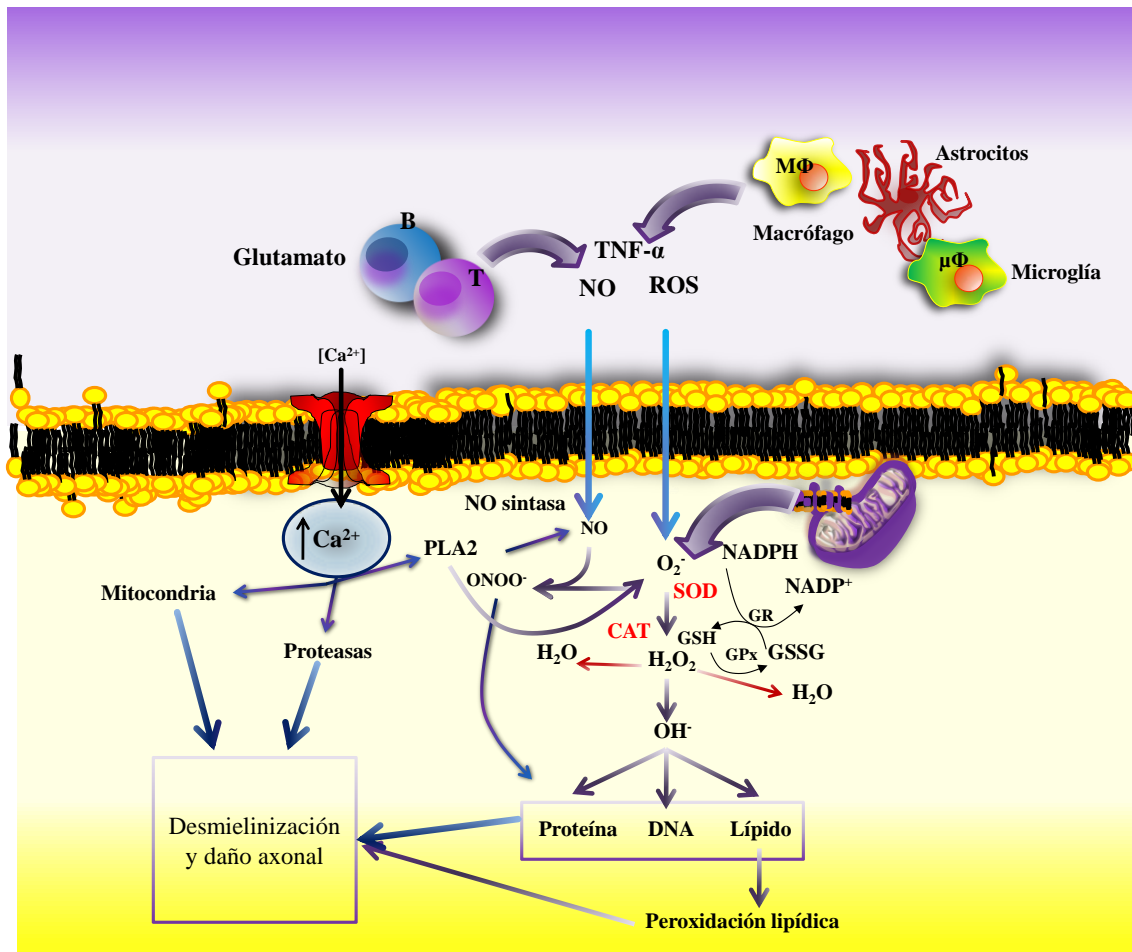


Figura 7: Estrés oxidativo en la fase degenerativa de la esclerosis múltiple.

1.7. HISTOPATOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Desde un punto de vista histológico, la EM se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones, denominadas placas, con distintos grados de desmielinización, cuyo tamaño varía entre 2-6 mm. Estas placas se distribuyen a lo largo de todo el SNC, aunque hay zonas con mayor cantidad. Estas lesiones se centran principalmente en la sustancia blanca como son los nervios del quiasma óptico, el tronco cerebral, láminas cerebelosas y en la médula espinal. No obstante, existen lesiones en la sustancia gris, detectadas por primera vez en 1962 por Brownell (Brownell y Hughes, 1962). Por otra parte, existe una relación clara entre las placas de desmielinización y las estructuras vasculares: casi todas las lesiones de pequeño o medio tamaño se encuentran alrededor de una vena (Trapp y col., 1999).

La clasificación de las placas encontradas en los pacientes con EM es compleja (Lassmann, 1998, Lassmann y col., 1998). El sistema de clasificación utilizado principalmente en investigación se basa en estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y técnicas de inmunohistoquímica basadas en tinciones de mielina, tinciones de axones y en marcadores de microglía y linfocitos. La distribución de la microglía, así como de moléculas que expresan en su membrana MHC-I, MHC-II, MACI y LFA-II, son claves para dicha clasificación (Lucchinetti y col., 2000, Love, 2006). Atendiendo a este sistema, las placas se clasifican en:

-Placas activas: Con infiltrados perivasculares de linfocitos y macrófagos a lo largo de todo el parénquima cerebral. Los macrófagos suelen presentar en su interior restos de mielina. Si el contenido linfocitario es elevado, se consideran placas activas recientes. Lucchinetti y colaboradores (2000) estudiaron, en biopsias de pacientes con EM, estas lesiones mediante inmunohistoquímica y determinaron cuatro subtipos: I, II, III, IV (Lucchinetti y col., 2000). La lesión tipo II es el subtipo más común encontrado y se caracteriza por presentar, además de células T y macrófagos, anticuerpos y complemento (Cross y Waubant, 2011).

-Placas inactivas: Son placas con pocas células linfoides con alta densidad de gliosis y densidades bajas de axones.

-Placas crónicas activas: Se caracterizan por tener una zona central con escasas células linfoides con densa gliosis. En la zona periférica de la placa, se observan macrófagos con restos de mielina en su interior.

-Placas en sombra: Son zonas concretas y reducidas en las que se observan axones remielinizados defectuosos.

Alrededor de todas estas placas, es común observar acúmulos de astrocitos, microglía y macrófagos que secretan CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 así como células B (Prineas y Graham, 1981). Hoy en día, se ha detectado la presencia de estas células en lesiones tanto activas como crónicas mediante RMN (Cross y Waubant, 2011).

Estudios histológicos detallados de las placas activas revelan que existe una distribución espacial de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (Mars y col., 2011). Los linfocitos T CD4⁺ se localizan en áreas perivenulares mientras que los linfocitos T CD8⁺ se distribuyen en el centro y en los bordes de la lesión (Hemmer y col., 2006). En la EM, la abundancia de células T CD8⁺ se ha correlacionado con la intensidad del daño axonal

(Saxena y col., 2011). Además, existen en estas placas depósitos de Ig, siendo mayores en las placas activas recientes (Wootla y col., 2011).

1.8. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Desde un punto de vista clínico, la EM se caracteriza por recaídas y remisiones de alteraciones neurológicas, siendo la forma recurrente-remitente la más frecuente (Keegan y Noseworthy, 2002). Los síntomas de la EM incluyen una discapacidad sensorial y motora, que se acompaña de alteraciones de las funciones cognitivas en casi el 50% de los pacientes con EM (Kujala y col., 1996, 1997, Bobholz y Rao, 2003, Amato y col., 2013a). La dificultad en el aprendizaje y la memoria representan el déficit más común y ésta lo desarrollan pacientes que presentan una patogenia progresiva de la enfermedad (Bobholz y Rao, 2003).

La EM se manifiesta casi siempre entre los 20 y 40 años de edad, la aparición en personas menores de 10 años o mayores de 50 es poco frecuente, oscilando entre el 2-5%. Cuando se presenta entre los 40 y 50 años, suele estar solapada con otras enfermedades mientras que entre los 10 y 20 años, suele seguir un curso benigno y aparece con una frecuencia del 7-28%.

El curso clínico de la EM es muy variado y permite diferenciar distintos tipos:

- Benigna: Aparición de un brote de escasa importancia con remisión total. El paciente no muestra limitaciones y no sufre nuevos síntomas hasta pasados unos 15 años del diagnóstico inicial (**Figura 8**).
- Recurrente-remitente (EMRR): Aparece un primer brote con distintos grados de limitación, como son trastornos visuales, motores y de comunicación, seguidos de un periodo de remisión. Transcurrido un intervalo de tiempo, se desarrolla un segundo brote. Un 83-90% de los pacientes con EM presentan este tipo (**Figura 8**).
- Progresiva primaria (EMPP): Tras la aparición del primer brote, la enfermedad se agrava de forma continua sin remisión. El 10% de los pacientes con EM presentan este tipo (**Figura 8**).
- Progresiva secundaria (EMPS): Casi el 50% de los casos de pacientes con EMRR tras un periodo de remisión de 10 años terminan desarrollando este tipo de EM, que se caracteriza por una falta de

remisión completa de los síntomas y que se agrava con el paso del tiempo (**Figura 8**).

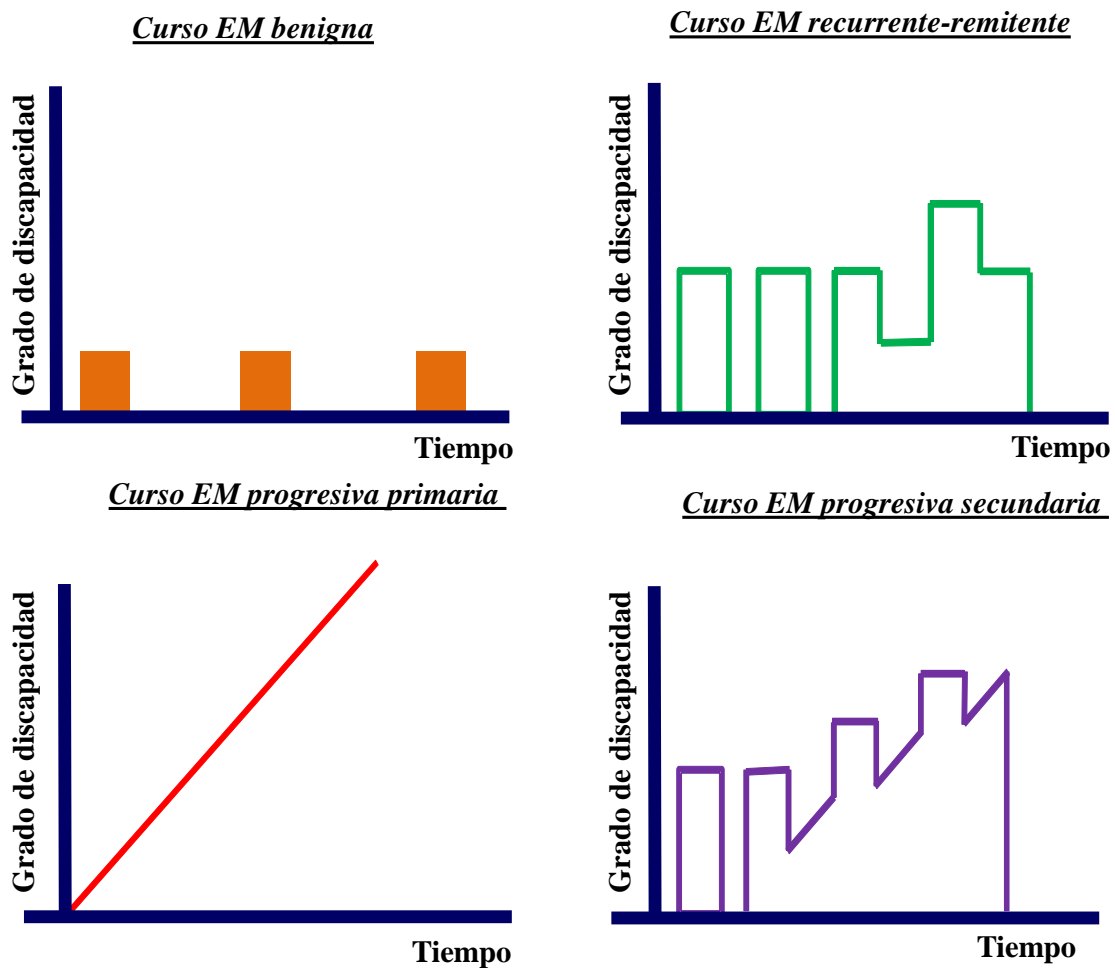


Figura 8: Representación esquemática de los tipos de esclerosis múltiple en función de los signos clínicos.

1.9. DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Para el diagnóstico de la EM, es necesario tener en cuenta una serie de parámetros como son los signos clínicos observables (discapacidad motora, visual y cognitiva), por otro lado, las lesiones diseminadas en el SNC. Los criterios que se utilizan hoy en día para dicho diagnóstico se basan en los criterios de Mc Donald (McDonald y col., 2001). En ellos, se valoran los ataques, las lesiones y las diseminaciones de dichas lesiones en el espacio y en el tiempo. Para poder realizar un diagnóstico, se recurren a diversas metodologías como son:

-Resonancia magnética (RM): con ella, se localizan y se valoran las lesiones así como la morfología e intensidad de las mismas. En función de la intensidad de la señal con gadolinio de contraste, se puede distinguir entre lesiones nuevas y antiguas.

-Examen del líquido cefalorraquídeo: En el 96 % de los pacientes con EM, se presenta síntesis intratecal de Ig, por lo que su medición en el LCR es un marcador que permite caracterizar la naturaleza inflamatoria.

-Potenciales evocados: dicho parámetro se mide utilizando un electroencefalograma. En particular, se estudian los potenciales evocados visuales, permitiendo valorar la velocidad e intensidad de los impulsos cuando los ojos son estimulados.

A pesar de la existencia de estos sistemas de diagnóstico, es necesario encontrar métodos más rápidos que permitan iniciar los tratamientos antes y discriminar entre patologías desmielinizantes muy similares. Por ello, en Mayo de 2010, se reunió el Grupo Europeo de Magnetic Resonance Network in Multiple Sclerosis (MAGNIMS) para examinar los requisitos y las aplicaciones de los criterios de Mc Donald en diferentes poblaciones, principalmente en la pediátrica. En dicha reunión, se concretó la diferencia entre la EM y la neuromielitis óptica (NMO), una patología que presenta gran similitud con la EM, y acordaron que el péptido Acuaporina 4 (AQP4) sería el parámetro diferencial para distinguir ambas patologías (Polman y col., 2011). Propusieron, además, la necesidad de buscar otros biomarcadores en sangre periférica y en LCR más específicos y tempranos y refinar los criterios de diagnóstico basados en las técnicas de imagen en función del tamaño, localización y evolución de las lesiones a lo largo del tiempo (Polman y col., 2011).

1.10. TRATAMIENTOS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Hasta la fecha, no se conoce ningún tratamiento eficaz para la EM. El abordaje terapéutico de esta enfermedad requiere diversas estrategias. Por un lado, se administran fármacos encaminados a controlar la intensidad de los síntomas en los brotes y, por otro lado, se realizan tratamientos encaminados a retardar la progresión de la enfermedad. El objetivo de todos ellos es proporcionar la mejor calidad de vida posible a los pacientes.

En los periodos de brote de la enfermedad, se utilizan los esteroides para tratar la gravedad e intensidad de los síntomas, las benzodiacepinas para reducir los espasmos

musculares, los medicamentos colinérgicos para disminuir los problemas urinarios y los antidepresivos para tratar las depresiones.

Los tratamientos encaminados a disminuir la progresión de la enfermedad son de diferente índole; unos están encaminados a la modulación de las células del sistema inmunológico (inmunomoduladores/inmunosupresores), otros están encaminados a evitar su migración al SNC, mientras que algunos poseen propiedades antioxidantes, para contrarrestar las ERO y ERN que se producen.

1.10.1. Terapias inmunomoduladoras de la EM

Las terapias tradicionales en la EM son aquellas dirigidas contra las células del sistema inmunológico, entre las que destaca el uso de interferón. El **IFN- β** , por ejemplo, se utiliza en el tratamiento de la EMRR y aunque su mecanismo de acción no se conoce completamente, se ha observado que reduce los niveles de ARNm de la IL-23, inhibe la diferenciación de las células Th17 y regula los niveles de IL-10. El resultado final consiste en una disminución de la activación de las células T efectoras y en un aumento de la actividad de las células T supresoras.

El **acetato de glatirámico** fue el primer inmunomodulador no esteroideo distinto al IFN utilizado en tratamiento de la EMRR. Este compuesto es un copolímero constituido por la mezcla de cuatro aminoácidos naturales (L-glutamato, L-tirosina, L-alanina y L-lisina) que reduce los niveles de expresión del IFN- γ y mantiene estables los niveles de expresión de la IL-4. También se ha observado que potencia la actividad de los linfocitos T_{reg}. El tratamiento a largo plazo con el acetato de glatirámico reduce la frecuencia de los brotes y los pacientes permanecen neurológicamente estables.

Otro medicamento diseñado para inhibir selectivamente la activación de células T es el **daclizumab**, un anticuerpo monoclonal contra la cadena α del receptor de IL-2. Este medicamento se prescribe para el tratamiento de pacientes con trasplante de riñón y, dado su mecanismo de acción, se ha planteado su utilización para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Los primeros estudios en modelos de enfermedades autoinmunes mostraron efectos múltiples en el sistema inmune innato. Específicamente, daclizumab aumenta y activa células inmunorreguladoras CD56^{bright+} como las células NK. En la EM, se ha observado que estas células acceden al parénquima cerebral y pueden matar a las células T autoreactivadas. Por todo ello, se considera el daclizumab

como un potente inhibidor de las células T específicas de antígeno (Bielekova, 2013). En el momento actual, se encuentra en fase III para pacientes con EMRR y EMSP.

La **mitoxantrona** induce *ex vivo* a las células Th2 a secretar interleuquinas inmunosupresoras como IL-4 e IL-5. Este medicamento fue aprobado para el tratamiento de EMRR y EMSP pero se considera un agente de segunda línea debido a las cardiomiopatías, leucemias, leucopenia e infecciones que produce (Amedei y col., 2012).

Se han desarrollado algunos tratamientos contra las células B como es el tratamiento con el fármaco **rituximab**. Se trata de un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno CD20 de los linfocitos B, induciendo muerte celular vía apoptosis. Este medicamento se encuentra en fase III, aunque se han encontrado ciertos casos de pacientes que han sufrido poliomielitis.

Entre los tratamientos dirigidos a la modulación y tráfico de las células inmunes, se encuentran aquellos fármacos como el **natalizumab**, que fue aprobado en el año 2004 para el tratamiento de la EMRR, después de demostrar prometedores resultados en la fase III de ensayos clínicos. Presenta un mecanismo de acción novedoso, bloqueando el tráfico de linfocitos a través de la BHE. Natalizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad α -4 de la integrina VLA y es necesaria para la migración de los linfocitos, monocitos y otros tipos celulares a través de la BHE. Además, esta integrina parece estar involucrada en procesos de co-estimulación de células T, por lo que el natalizumab, además de impedir la migración linfocitaria, modula la proliferación de las células T. Los resultados de las pruebas de AFFIRM han demostrado que este medicamento disminuye en un 68% los brotes en un año, disminuyendo sustancialmente la discapacidad al 42% en dos años, y la actividad de las lesiones. Aunque la tolerancia al tratamiento es buena, parece estar relacionada con casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva asociada al virus JC, lo que obligó a su retirada en 2006. Tras 2 años de estudios, se ha reintroducido el tratamiento con natalizumab en pacientes con EMRR en un periodo no superior a un año.

Otro medicamento aprobado recientemente es el **fingolimod (FTY720)**, un modulador del receptor 1 de la esfingosina 1-fosfato (S1P-R). En linfocitos, este receptor responde a varios estímulos que señalan su salida de los ganglios linfáticos tras ser activados por las APC. En los primeros estudios en modelos animales, el fingolimod

previno la aparición de la EAE. El efecto inmunomodulador del fingolimod se basa en dos vías: por un lado, inhibe la función de S1P1, impidiendo la salida de las células T activas de los ganglios linfático y, por otro lado, modula la expresión de S1P1 por parte de oligodendrocitos, neuronas, astrocitos y microglía, disminuyendo así la neuroinflamación (Amedei y col., 2012). Los ensayos clínicos en fase II y III han descrito algunos efectos secundarios como infecciones y deficiencias cardiovasculares pero, a pesar de ello, se ha demostrado una reducción de los brotes en el 90% de los casos por lo que en el 2011, la agencia europea del medicamento (EMA) autorizó su utilización en pacientes con EMRR muy activa o bien en pacientes que no han respondido al tratamiento con IFN- β .

Además de los tratamientos anteriormente expuestos, existen otros tratamientos inmunomoduladores utilizados en la EM como son la azatioprina, la ciclofosfamida o la ciclosporina, entre otros.

1.10.2. Terapia antioxidante en la EM

Debido a la implicación del estrés oxidativo en la patogenia de la EM y el descubrimiento, *in vitro*, de moléculas antioxidantes capaces de contrarrestar el efecto deletéreo de los radicales libres, se están desarrollando terapias antioxidantes para el tratamiento de la EM.

Los primeros estudios en modelos animales demostraron que la inyección de catalasa en animales de experimentación, antes de la inducción de la EAE, retrasaba la aparición de los síntomas de la enfermedad (Guy y col., 1989a, b, Guy y col., 1998). Por otro lado, estudios de inhibición de la NOSi con aminoguanidina han mostrado que impide el desarrollo de la EAE en ratas al disminuir la expresión de citoquinas proinflamatorias y la desmielinización (Brenner y col., 1997). Por ello, parte de la terapia antioxidante se encamina hacia la modulación de la actividad de las enzimas antioxidantes.

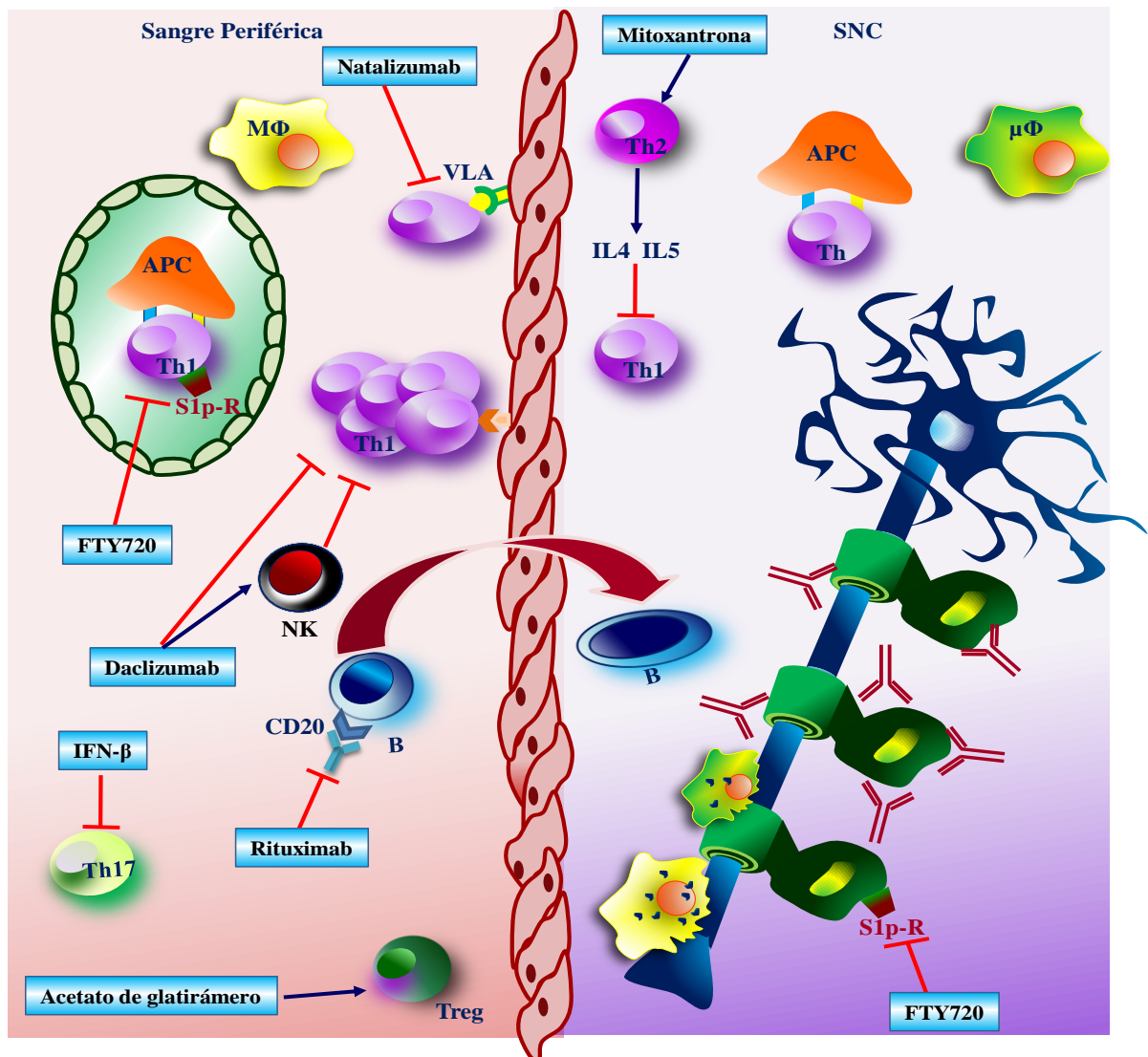


Figura 9: Representación esquemática del mecanismo de acción de los inmunomoduladores utilizados en el tratamiento de la esclerosis múltiple

Otra vía en la terapia antioxidante se encamina en encontrar compuestos que actúen como antioxidantes directos. En este sentido, hay estudios sobre la utilización de compuestos endógenos como el ácido úrico, el ácido lipoico y la bilirrubina o la utilización de compuestos exógenos como el dimetilfumato, los ácidos grasos omega-3, las vitaminas, las estatinas y extractos de té verde o de *Ginkgo biloba*.

El **ácido úrico** es un potente detoxificador de las ERN y, especialmente, del peroxinitrito. Tanto en los periodos de recidiva como en los periodos de remisión de la enfermedad, los pacientes con EM presentan bajos niveles de ácido úrico, por lo que

una de las estrategias terapéuticas se enfoca hacia la administración de dicho compuesto. Estudios en ratas con EAE tratadas con ácido úrico administrado intraperitonealmente, han descrito una disminución de la severidad de los brotes de la enfermedad (Hooper y col., 1998), por lo que se considera una atractiva estrategia terapéutica tanto para la EM como para otras enfermedades neurodegenerativas.

El **ácido lipoico** es un compuesto antioxidante que presenta varios mecanismos de acción. Por un lado, es capaz de detoxificar radicales libres por sí solo y, además, es capaz de inducir la activación de ciertos compuestos antioxidantes como el glutamato (Marracci y col., 2004). Una ventaja adicional del ácido lipoico es su capacidad de atravesar la BHE y actuar en el SNC (Mirshafiey y Mohsenzadegan, 2009).

En mamíferos, la biliverdina es transformada en bilirrubina por acción de la biliverdina reductasa. La **bilirrubina** ha mostrado ser un potente antioxidante, mayor incluso que la catalasa y la SOD, especialmente en condiciones patológicas. Además, se ha observado en cultivo primarios de oligodendrocitos de rata que la bilirrubina es capaz de impedir la muerte celular producida por el H_2O_2 . Por ello, se está estudiando como posible tratamiento para la EM.

Entre los compuestos exógenos destaca el uso del **dimetilfumarato** y su metabolito activo el metil-hidrogeno-fumarato, que conducen a una disminución del estrés oxidativo y protección axonal de mediadores inflamatorios (Minagar, 2013). Este medicamento ha sido aprobado recientemente (abril del 2013) por la FDA para de tratamiento de pacientes con EMRR (FDA 2013).

A pesar de los avances en el tratamiento de la EM, en el momento actual no hay un tratamiento efectivo, por lo que es necesario seguir investigando estrategias terapéuticas.

1.10.3. Sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina (PEA)

La etanolamina forma parte de un fosfolípido de membrana, la fosfatidiletanolamina (PE), cuya función es mantener la fluidez de la membrana lipídica. Además, es precursora de otras biomoléculas como la colina y la anandamida (Hansen y col., 2000). La etanolamina también se puede encontrar como plasmalógeno de etanolamina, un tipo de fosfolípido caracterizado por la presencia de un enlace éter

de vinilo en la posición 1 y un enlace ester en la posición 2. Esta forma de etanolamina está presente principalmente en las vainas de mielina del SNC y en el músculo cardíaco.

En la década de los sesenta, el doctor Nieper, en Alemania occidental, comenzó a utilizar una sal de Ca^{2+} , magnesio (Mg^{2+}) y K^{+} de fosfoetanolamina (PEA) en el tratamiento de distintas enfermedades autoinmunes (Nieper, 1962, Nieper y Blumberger, 1962). Aunque no hay constancia en la bibliografía de ningún ensayo clínico controlado con PEA, sí hay trabajos básicos sobre la acción de la etanolamina y sus derivados en cultivos “in vitro”. Así, se ha descubierto que derivados de etanolamina inhiben la activación de las células T (Legler y col., 2001) y que estimula la proliferación de NK en cultivos in vitro (Pierson y col., 1995).

Por otro lado, se ha observado que los plasmalógenos de etanolamina son poderosos antioxidantes que previenen la oxidación de las membranas celulares, impidiendo la oxidación del colesterol y la peroxidación de lípidos (Maeba y col., 2002, Maeba y Ueta, 2003a, b). También, se ha argumentado que ciertos derivados de etanolamina facilitan los procesos cognitivos, aumentan selectivamente la transducción de señales en neuronas (Florio y col., 1999) y posee propiedades neuroprotectoras (Hansen y col., 2002).

Esta dualidad de acción por parte de la etanolamina, junto con la implicación del SI y el estrés oxidativo en la EM, hacen que la sal de Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} de fosfoetanolamina sea un potencial candidato para el tratamiento de la EM.

2. EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO

2.1. DESCRUBRIMIENTO DE LA SOMATOSTATINA

Los efectos biológicos de la somatostatina (SST) fueron descubiertos a finales de 1960 en dos estudios independientes. Por un lado, en 1968, Krulich y colaboradores (Krulich y col., 1968) descubrieron una sustancia en el hipotálamo ovino que era capaz de inhibir la secreción de la hormona de crecimiento (GH), o somatotropina, *in vitro* en

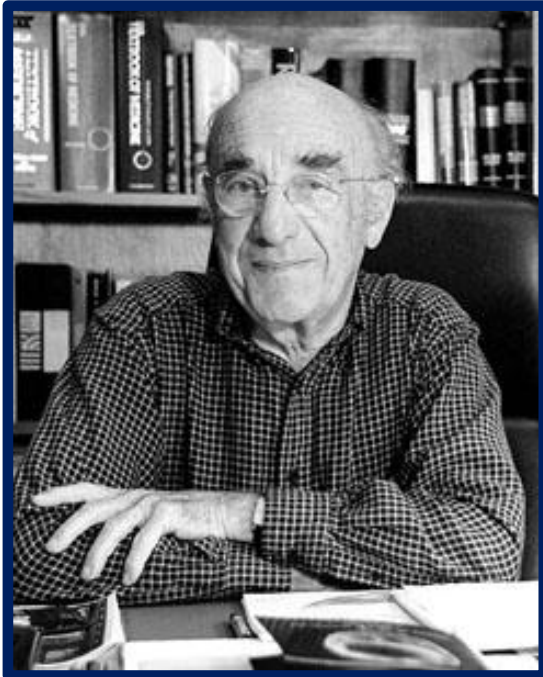


Figura 10: Roger Guillemin (1924-act.)

cultivos de células adenohipofisarias y, por otro lado, en 1969, Hellman y Lernmark descubrieron un potente inhibidor de la insulina en extractos de islotes pancreáticos. Fue en 1973 cuando, en el laboratorio de Roger Guillemin, se aisló y se identificó un tetradecapéptico, el cual se bautizó con el nombre de “factor inhibidor de la somatotropina”, por poseer una acción fisiológica antagónica al “factor liberador de la somatotropina”, y posteriormente somatostatina (SST) (Guillemin y col., 1973). Por este trabajo, Roger Guillemin fue

galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1977. En los años posteriores, aparecieron multitud de trabajos relacionados con la SST. Se observó que la síntesis de la SST no estaba restringida al hipotálamo, sino que estaba presente en el SNC, sistema nervioso periférico (SNP), tracto gastrointestinal, y en la mayoría de los órganos periféricos (Dubois y col., 1975, Hökfelt y col., 1975, Pelletier y col., 1975, Polak y col., 1975, Patel y Reichlin, 1978). Así mismo, se describió la presencia de SST inmunoreactiva en varios tejidos tanto de organismos vertebrados como de invertebrados e incluso en el reino de las plantas (Y.C., 1992, Tostivint y col., 2004).

Dada su distribución en múltiples tejidos, los efectos biológicos de la SST son muy diversos. Interviene en la modulación de la neurotransmisión, secreción glandular, contracción de la musculatura lisa, absorción de nutrientes, proliferación celular y

modulación del sistema inmunológico (Reichlin, 1986, Lichtenauer-Kaligis y col., 2000, ten Bokum y col., 2000, Barnett, 2003).

2.2. ESTRUCTURA DE LA SOMATOSTATINA

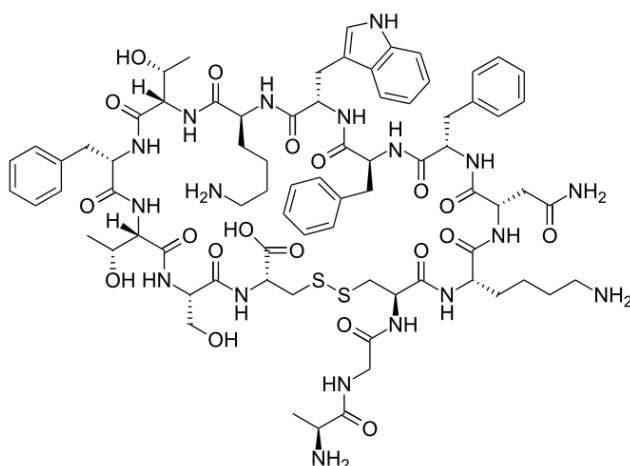


Figura 11: Estructura molecular de la somatostatina-14

catorce aminoácidos en el extremo N-terminal, la cual fue aislada y caracterizada por Pradayrol y colaboradores en 1980. Ambos péptidos, presentan un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína que se encuentran en las posiciones 3 y 14, lo que les confiere una conformación cíclica (Pradayrol y col., 1980) (**Figura 11**).

Mediante modificaciones estructurales del anillo de la SST, se ha localizado el centro activo entre los aminoácidos 7 y 10 (Brown y col., 1977). La SST natural no es un fármaco muy útil en la práctica clínica debido a que su vida media es corta (un minuto para la SST-14 y tres minutos para la SST-28), por lo que se han desarrollado análogos sintéticos de la SST con una mayor estabilidad metabólica y mayor duración. Estos análogos conservan los aminoácidos que conforman el centro activo de la SST y tienen una mayor semivida, potencia y selectividad en la inhibición de la secreción hormonal. Entre los análogos desarrollados, destacan el SMS 201-995 (Octreótido) y el BIM 23014 (Lanreótido). El SMS es un octapéptido con una mayor estabilidad frente a la degradación enzimática lo que, unido a su reducido aclaramiento hepático, le confiere una semivida de al menos 30 veces la del péptido natural. A nivel clínico, se utiliza para inhibir de manera preferente la secreción de la GH, así como en el tratamiento de carcinomas, neoplasias y la acromegalia. El Lanreótido es un análogo de SST ligado a

La SST es una familia de hormonas producidas principalmente por células endocrinas normales (Reichlin, 1986, Barnett, 2003). Entre los diferentes péptidos, destacan dos con actividad biológica, la SST-14, que se la forma molecular que se identificó originalmente en el hipotálamo y está formada por catorce aminoácidos, y la SST-28, que presenta una prolongación de

microesferas encapsuladas de un copolímero láctico-glicólico, lo que determina una liberación lenta y una semivida de 16 horas; se utiliza principalmente para el tratamiento de tumores tiroideos. Recientemente, se han generado análogos de SST de segunda generación entre los que destaca el SOD230 o Signifor (Pasireótido) que presenta alta afinidad por todos los receptores de SST y una estabilidad similar a la del Octreótido. Los estudios preclínicos del Pasireótido lo hacen un buen candidato para el tratamiento de pacientes con acromegalia que presentan resistencia ante el Octreótido y el Lanreótido, así como para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Cushing, adenomas pituitarios y tumores sólidos que expresan receptores de SST (Ben-Shlomo y Melmed, 2007, Theodoropoulou y Stalla, 2013). Otros análogos desarrollados, como el CGP23996, se utilizan como trazadores (E. y col., 2001) (**Figura 12**).

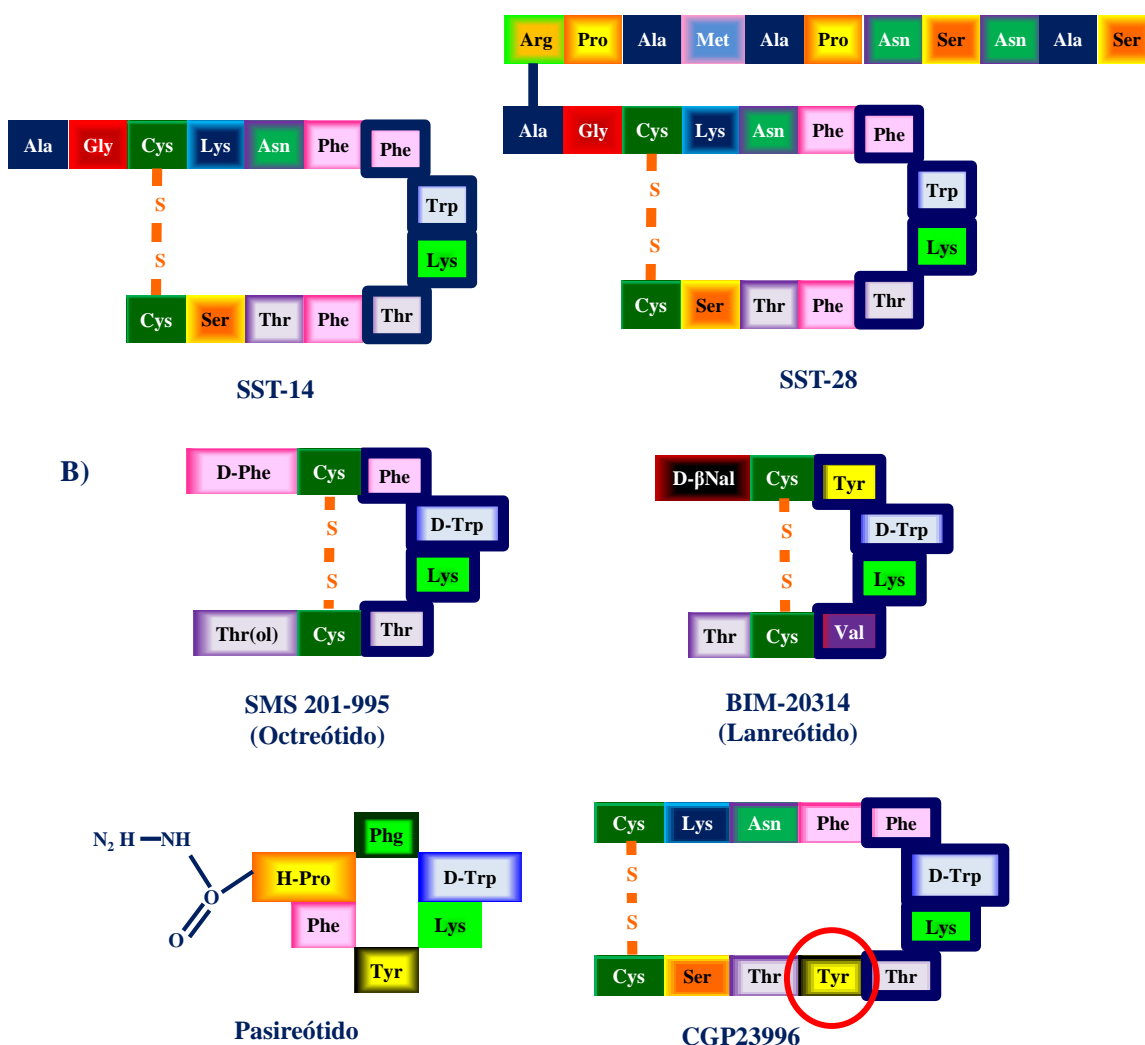


Figura 12: Estructura química de la SST-14 y la SST-28 (A) y de los análogos de SST (B). En contorno azul se destaca el centro activo de las moléculas, en naranja los puentes disulfuro y con un círculo rojo la Tyr susceptible de yodación en el análogo CGP23996.

2.3. BIOSÍNTESIS DE LA SOMATOSTATINA

2.3.1. Estructura del gen de la somatostatina

Los genes que codifican para la SST son diferentes en peces y en mamíferos. En peces, hay dos genes independientes que codifican para cada una de las dos isoformas bioactivas de la SST. En mamíferos, tanto la SST-14 como la SST-28 derivan de una única molécula precursora, la prepro-SST, que está codificada por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 3. La región codificante del gen consta de dos exones de 238 y 367 pares de bases (pb) separados por un intrón de 621 pb. Entre los dos promotores (caja TATA y CAAT) del extremo 5' se encuentra una secuencia palindrómica de 8 pb [5'-TGACGTCA-3'] que se denomina elemento de respuesta al adenosin monofosfato cíclico (AMPc) o CRE. A ambos lados del gen, se encuentra una secuencia de ácido desoxirribonucleico Z (ADN-Z) al que se unen determinadas proteínas para regular la expresión génica (Papachristou y col., 1994) (**Figura 13**).

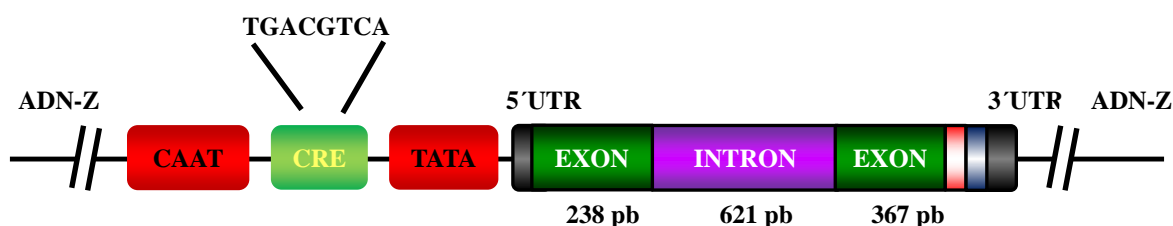


Figura 13: Estructura del gen de la somatostatina de rata

2.3.2. Biosíntesis de la somatostatina

La prepro-SST, molécula precursora de la SST, es una molécula de 116 aminoácidos que se sintetiza en el ribosoma y posteriormente pasa al retículo endoplasmático rugoso. En una primera etapa, se pierde el péptido señal de 24 aminoácidos por ruptura entre la glicina-24 y la glicina-25, generando un péptido de 92 aminoácidos y 10 kDa, la pro-SST. Esta pro-SST es transportada al aparato de Golgi y penetra en vesículas de secreción donde sufre un proceso de maduración por acción enzimática. La pro-SST se hidroliza por tres dominios distintos generando diversos fragmentos sin actividad biológica, como son la SST-28_[1-12], pro-SST_[1-76], la pro-SST_[1-63] y la pro-SST_[1-10], así como los dos fragmentos bioactivos, la SST-14 y la SST-28. La ruptura proteolítica de la pro-SST por el dominio dibásico (Arg/Lys) y el dominio

monobásico (Arg) del extremo C-terminal generan la SST-14 y SST-28, respectivamente, mientras que la hidrólisis por el dominio monobásico (Lys) del extremo N-terminal da lugar a la pro-SST_[1-10] o antrina (denominada así por su descubrimiento en el atrio gástrico, donde se encuentra en grandes cantidades) (Benoit y col., 1987, Kumar y Grant, 2010). Este procesamiento se realiza por la acción de unas endopeptidasas de la superfamilia de las prohormona convertasas (PC). Hasta el momento, se han identificado ocho tipos de PC denominadas PC1-6, furina y PACE-4 (Brakch y col., 1995, Galanopoulou y col., 1995a, b, Patel y col., 1997, Kumar y Grant, 2010) (**Figura 13**).

Recientemente, por análisis bioinformático de secuencias conservadas en la evolución, se ha identificado la neuronostatina (NST), un péptido lineal de 13 aminoácidos codificado por el gen de la prepro-SST (Samson y col., 2008, Martel y col., 2012). En cultivos de neuronas hipotalámicas de rata se ha observado que la SST y la NST se co-expresan pero sus actividades celulares son diferentes (Dun y col., 2010). De hecho, se piensa que los efectos de la NST están mediados por el sistema de la melanocortina (Martel y col., 2012) (**Figura 14**).

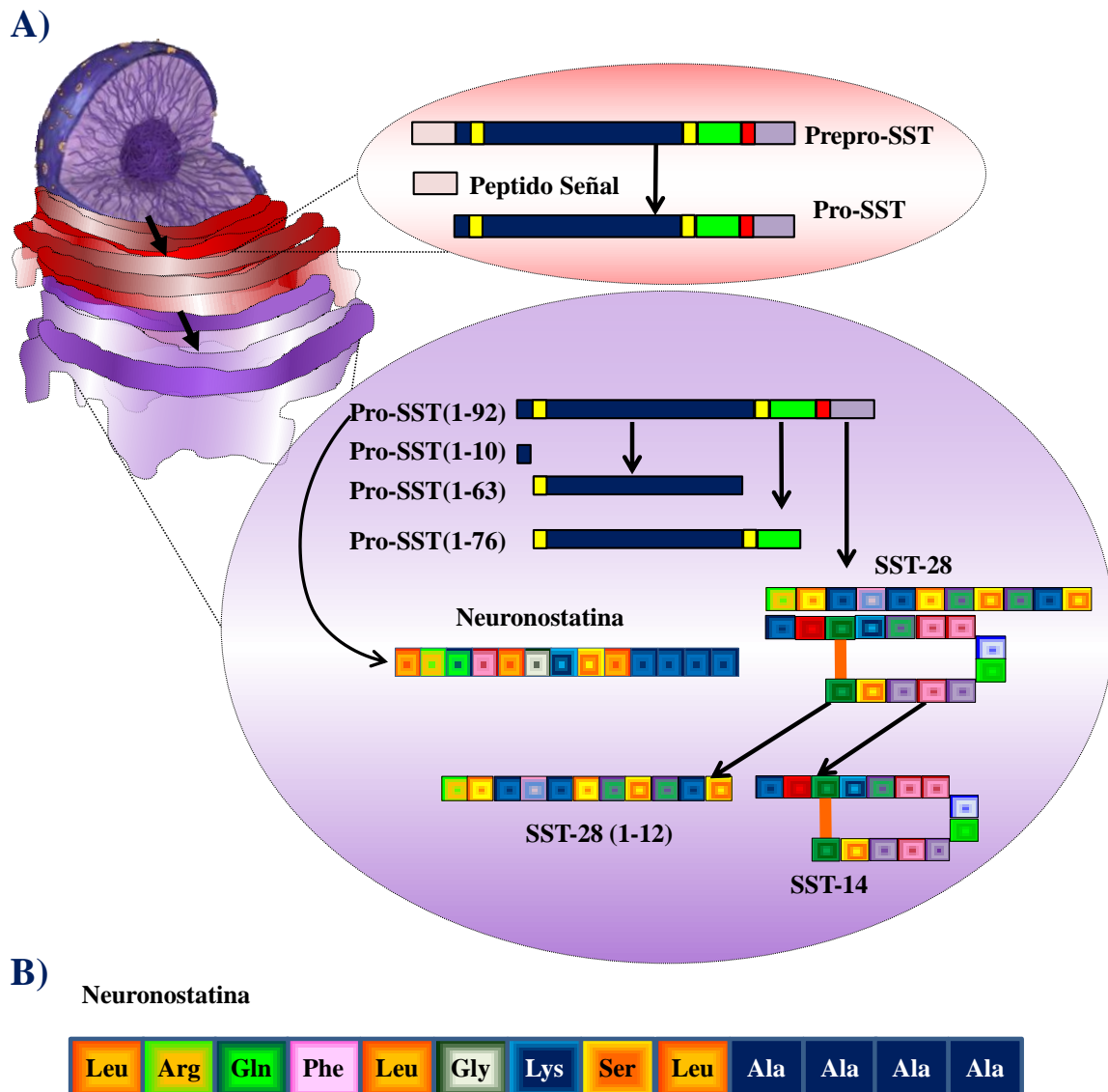


Figura 14: Esquema de la síntesis y maduración de la somatostatina (SST) en mamíferos (Panel A) y representación esquemática de la estructura primaria de la neuronostatina (Panel B).

2.3.3. Regulación de la expresión y secreción de la somatostatina

La expresión de la SST puede ser regulada a nivel génico por factores de transcripción, citoquinas, glucocorticoides, testosterona, estradiol, insulina, leptina, TGF- β , factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y agonistas de receptores de NMDA (Scanlan y col., 2003, Tung y col., 2008, Kumar y Grant, 2010) (**Tabla 2**). La acción de estos factores depende del tejido en el que actúen. No se conoce bien el

mecanismo molecular mediante el cual estas moléculas regulan la transcripción del gen de la SST pero se piensa que muchos de ellos actúan de manera indirecta modulando la vía del AMPc, puesto que se ha demostrado que éste aumenta los niveles de ARNm de la SST gracias a la región CRE del promotor (Tolón y col., 2000, Sánchez-Muñoz y col., 2011). La activación de la adenilato ciclasa (AC) conduce a un aumento de los niveles de AMPc que conlleva a la activación de la proteína quinasa A (PKA). A continuación, la subunidad catalítica de la PKA se trasloca al núcleo, donde fosforila y activa a la proteína de unión a CRE (CREB) así como a los co-activadores CBP (proteína de unión a CRE), que tiene actividad acetiltransferasa, y p300. Una vez fosforilada, p-CREB se une a la región CRE del promotor y recluta a las proteínas CBP/p300, los cuales favorecen la unión del complejo de transcripción a la caja TATA, activando así la expresión del gen de la SST (**Figura 15**).

Tabla 2: Factores que regulan la transcripción del gen de la somatostatina

Factores que modulan la transcripción del gen de la SST		
Aumenta	Disminuye	Aumenta o Disminuye
AMPc BDNF Ca ²⁺ Estrógenos GH GMPc IGF-I e IGF-II IL-1, IL-6, IL-10 NO Testosterona TNF	ACTH Insulina Leptina	Glucocorticoides

Abreviaturas: AMPc: adenosin 3',5',-monofosfato cíclico, GMPc: guanosin 3',5',-monofosfato cíclico. NO: óxido nítrico. TSH: tirotropina. GH: somatotropina. IGF: Factor de crecimiento de tipo insulina. IL: Interleuquina. TNF: Factor de necrosis tumoral. ACTH: corticotropina.

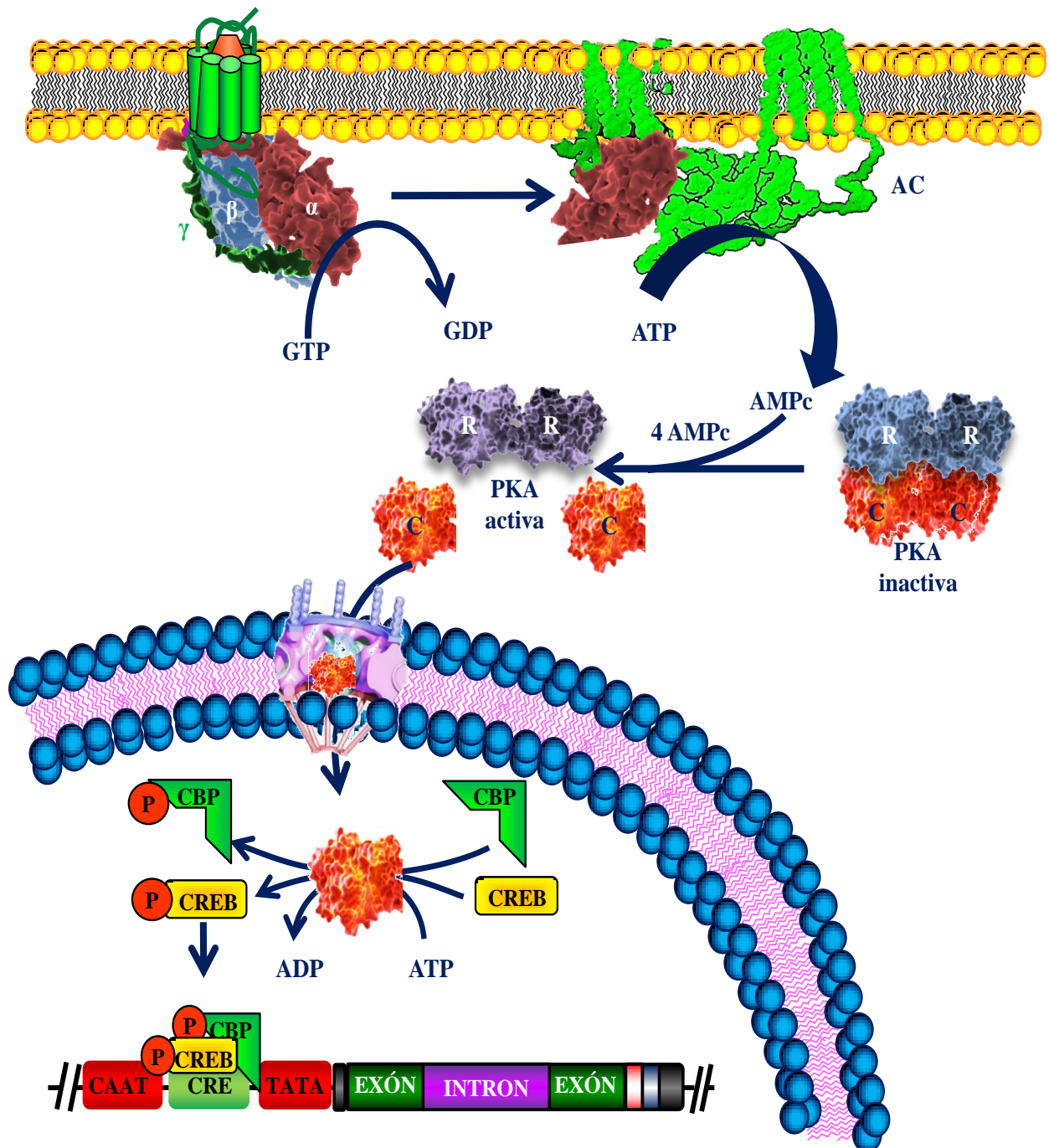


Figura 15: Regulación de la expresión del gen de la somatostatina mediante AMPc.

Cuando se une el ligando a su receptor GPCR, se produce un cambio conformacional en el receptor que conduce a una interacción con la proteína G heterotrimérica. Ésta sufre otro cambio conformacional que conlleva la liberación del guanosin 5'-difosfato GDP y entrada de guanosin 5'-trifosfato (GTP) en la subunidad α lo que conduce a su disociación. Posteriormente, la subunidad α se acopla a la adenilato ciclasa (AC), la cual transforma el adenosin 5'-trifosfato (ATP) en adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Este segundo mensajero se une a la proteína quinasa A (PKA), lo que conduce a la disociación de las subunidades catalíticas de las reguladoras y, por ende, a la activación de la PKA. La subunidad catalítica se trasloca al núcleo donde activa dos factores de transcripción: la proteína de unión a CRE (CREB) y la proteína de unión a CREB (CBP/p300). Dichos factores se unen al elemento de respuesta al AMPc (CRE), localizado en el gen de la SST, y activa la transcripción del gen.

En el caso del BDNF, existen varios mecanismos que participan en la activación de la transcripción del gen de la SST. Se ha descrito que el BDNF se une al receptor tirosina quinasa de tipo B, induciendo un aumento del calcio intracelular, lo cual activa a la calmodulina (CaM). Dicha CaM fosforila, por un lado, a la proteína CBP, favoreciendo la unión de CREB, y por otro lado activa a la AC, promoviendo la transcripción del gen vía PKA. También se ha planteado que el BDNF podría inducir la fosforilación de CREB a través de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno/proteína quinasa reguladora de señal extracelular (MAPK/ERKs) y a través de la vía del fosfatidil inositol 3-quinasa/serín treonin quinasa (PI3K/AKT) (Sánchez-Muñoz y col., 2011).

Los glucocorticoides son capaces de inducir un aumento o disminución de la transcripción del gen de la SST. En células PC12, por ejemplo, aumentan la transcripción de la SST a través de la vía del AMPc (Liu y col., 1994) mientras que en células de carcinoma, disminuye dicha expresión, acelerando la degradación de su ARNm (Liu y Patel, 1995).

La secreción de la SST se produce mediante una despolarización inducida de membrana, modulada por una amplia gama de moléculas tales como iones, nutrientes, neuropéptidos, neurotransmisores, citoquinas, hormonas y factores de crecimiento (**Tabla 3**).

Los efectos de los nutrientes tales como la glucosa, los aminoácidos, o los lípidos en la secreción de la SST parece ser dependiente del tipo de tejido. La glucosa, a nivel de las células δ de los islotes pancreáticos, por ejemplo, estimula la secreción de SST mientras que a nivel hipotalámico, inhibe dicha secreción (Rabbani y Patel, 1990). En el hipotálamo, la leptina es capaz de inhibir tanto la expresión como la secreción de la SST (Quintela y col., 1997a, Quintela y col., 1997b). Los glucocorticoides presentan un efecto bifásico en la secreción de la SST: a bajas dosis, estimulan la secreción mientras que a altas dosis la inhiben. Los mediadores inflamatorios tienen diferentes efectos sobre la secreción de la SST. Así, la IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ y el TNF- α estimulan la producción de SST mientras que el TGF- β la inhibe (Quintela y col., 1997b, Kumar y Grant, 2010).

Tabla 3: Factores que modulan la liberación de la somatostatina.

Efectos sobre la liberación de la somatostatina	
Estimula la secreción	Inhibe la secreción
Bombesina Glucocorticoides (bajas dosis) Glucagón Glucosa (en páncreas) Hormonas tiroideas IGF-I IL-1, IL-6, IL-10 Insulina (en hipotálamo) IFN- γ y TNF- α Neurotensina Sustancia P Somatotropina VIP (en neocortex y páncreas)	Adrenalina Corticotropina GABA Glucocorticoides (altas dosis) Glucosa (en hipotálamo) Insulina (en páncreas e intestino) Leptina Opiáceos Serotonina TGF- β VIP (en hipotálamo)

2.4. DISTRIBUCIÓN DE LA SOMATOSTATINA

Las células productoras de SST, o células somatostatinérgicas, son morfológicamente neuronas con múltiple prolongaciones dendríticas o células secretoras con extensiones citoplasmáticas cortas, como es el caso de las células δ del tracto gastrointestinal o las células δ de los islotes de Langerhans en el páncreas (Baetens y col., 1979). Los estudios de los últimos treinta años han demostrado que la SST está ampliamente distribuida por todo el organismo. El SNC, el SNP, el páncreas endocrino e intestino son las áreas con mayor concentración de SST. En menor proporción, la SST está presente en el tiroides, glándulas adrenales, glándulas submandibulares, riñón, órganos linfáticos, próstata, placenta y testículos (Patel y col., 1997, Patel, 1999). Debido al procesamiento diferencial de la prepro-SST, se producen diversas cantidades de SST-14 y SST-28 en los tejidos de mamíferos. La SST-14 predomina en el tejido nervioso y es prácticamente la única forma presente en la retina, páncreas, estómago y neuronas entéricas (Epelbaum y col., 1986, Viollet y col., 2008). La SST-28, a nivel periférico, se sintetiza principalmente en las células de la mucosa intestinal y representa solo el 20-30% del total de la SST inmunoreactiva (SST-IR) en el cerebro (Pelletier y col., 1975, Rabbani y Patel, 1988, 1990). En la rata, el 65% del total

de SST se encuentra en cerebro, el 25% en el páncreas y aproximadamente el 10% en el resto de órganos (Patel y Reichlin, 1978) (**Figura 16**).

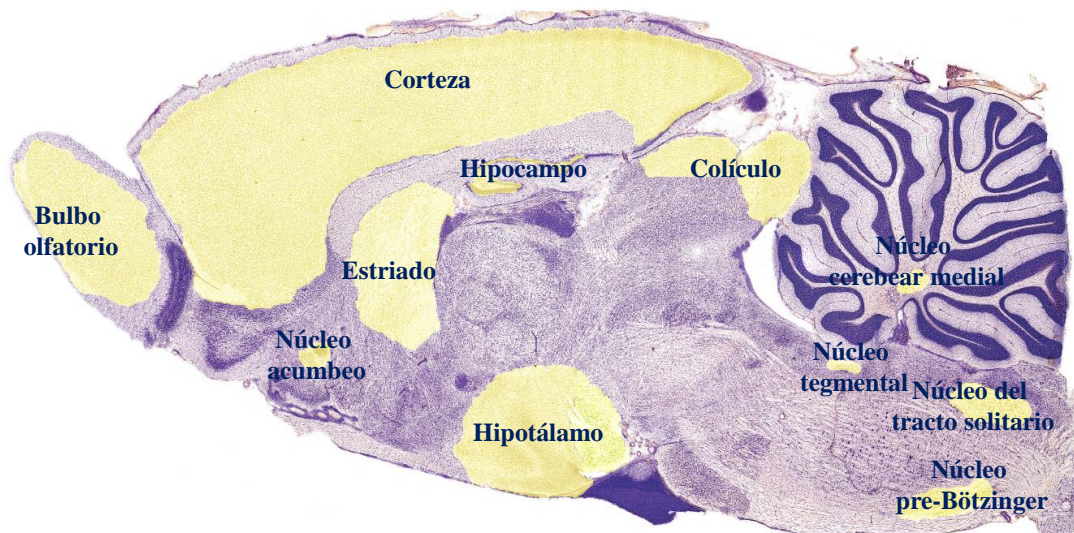


Figura 16: Corte histológico de cerebro de rata. En amarillo se destaca la distribución de las células somatostatinérgicas.

Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha demostrado que tanto en humanos como en ratas, el ARNm de la prepro-SST se encuentra ampliamente distribuido por el SNC (Garrett y col., 1994). Las áreas cerebrales con mayor concentración de SST son la amígdala, el septum, el tubérculo olfatorio, el sistema límbico y las capas II-III y IV-V de la corteza (Pelletier y col., 1975). La sustancia gris y el estriado son áreas con niveles moderados de SST mientras que el cerebelo presenta concentraciones muy bajas de SST (Schindler y col., 1996, Schindler y col., 1997).

Estudios inmunohistoquímicos en cerebro han mostrado que las neuronas somatostatinérgicas se pueden diferenciar en dos categorías: aquellas que actúan localmente dentro de microcircuitos (interneuronas) y aquellas neuronas que poseen proyecciones largas que actúan a distancia (neuronas de proyecciones largas). Las interneuronas somatostatinérgicas están distribuidas por todas las láminas corticales (Martel y col., 2012) y, recientemente, se ha descrito una gran población de interneuronas somatostatinérgicas en el núcleo olfatorio anterior y en el tubérculo olfatorio (Brunjes y col., 2011). Las neuronas somatostatinérgicas de proyecciones

largas se han localizado en varias áreas cerebrales, destacando el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral (Tomioka y col., 2005, Jinno y col., 2007, McDonald y col., 2012).

Tabla 4: Distribución de las células somatostatinérgicas.

Principales localizaciones	Tipo celular	Localización
Sistema Nervioso Central	Neuronas de proyecciones largas	Corteza Ganglios basales Ganglios autónomos Hipotálamo Médula espinal Sistema límbico
	Interneuronas	Amígdala Bulbo olfatorio Hipocampo Neocortex
Páncreas	Células δ	Islotes de Langerhans
Intestino	Células D Neuronas	Glándulas mucosas Plexos submucoso y mientérico
Otras localizaciones		
Glándulas adrenales	-	Células medulares dispersas
Tiroides	Células C	Células parafoliculares dispersas (coexisten con la calcitonina)
Sistema urinario	-	Células de los glomérulos renales y de los túbulos colectores
Sistemas sensoriales	-	Sistema auditivo Sistema olfatorio Sistema visual
Sistema inmunológico	-	Células T Células B

2.5. ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA SOMATOSTATINA

Dependiendo del nivel de actuación y de la función biológica, la SST se puede clasificar como: hormona, neurotransmisor, factor paracrino o factor autocrino:

- Neurohormona: se libera desde el sistema porta hipotálamo-hipofisario e inhibe la secreción de hormonas pulsátiles anterohipofisarias (Viollet y col., 2000).
- Hormona periférica: secretada por el aparato digestivo e inhibe la secreción hormonal pancreática (insulina, glucagón) (Baetens y col., 1979).
- Neurotransmisor: ejerce una acción inhibitoria de la actividad del SNC y autónomo (Patel y col., 1990).
- Factor autocrino: la SST secretada por las células epiteliales prostáticas actúa de manera autocrina a través de sus receptores, inhibiendo la proliferación celular (Zapata y col., 2004).
- Factor paracrino: factor de regulación local de actividades secretorias a nivel del páncreas o de la proliferación celular. En el tubo digestivo, la SST ejerce sus actividades en numerosos puntos. Sus acciones incluyen la regulación de la motilidad gastrointestinal, la secreción digestiva exocrina y las secreciones digestivas endocrinas.

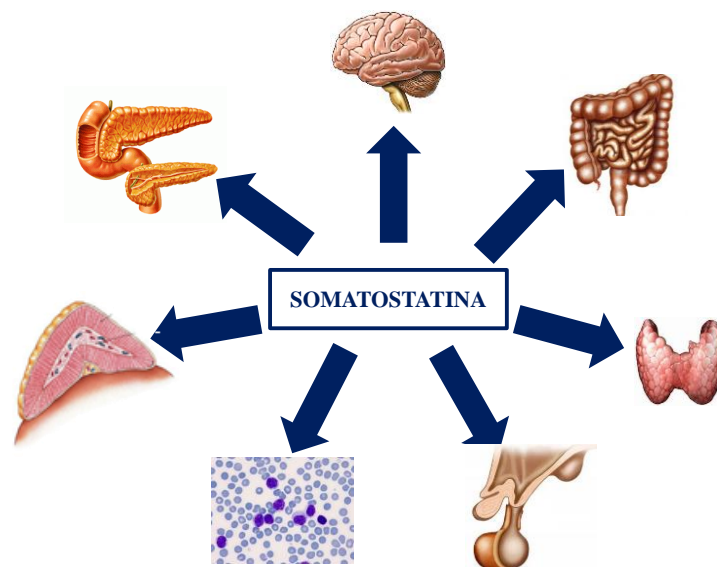


Figura 17: Órganos en los que actúa la somatostatina

2.5.1. Acciones fisiológicas a nivel periférico

La SST actúa en diferentes órganos periféricos como son el tiroides, el riñón, el tracto gastrointestinal, el sistema inmunológico y las glándulas adrenales. Su acción en los tejidos periféricos se puede agrupar en dos: inhibición de la secreción e inhibición de la proliferación celular (**Figura 17**).

En el **tiroides**, la SST es capaz de inhibir la secreción de la triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) de las células parafoliculares tiroideas estimuladas por la hormona estimulante de tiroides (TSH). A nivel de la **glándula adrenal**, la SST inhibe la liberación de la aldosterona estimulada por la secreción de la angiotensina II así como la liberación de catecolaminas mediante la estimulación medular de la secreción de acetilcolina. En el **riñón**, la SST es capaz de inhibir la secreción de renina cuando se estimula por una hipovolemia y la absorción de agua mediada por la hormona antidiurética (ADH) (Patel y Reichlin, 1978). En el **tracto gastrointestinal**, inhibe la secreción del ácido gástrico, pepsina, bilis y fluido colónico. La SST también tiene un efecto supresor de la motilidad del tracto intestinal inhibiendo el llenado gástrico, la contracción y la segmentación intestinal ya que antagoniza la acción miorelajante de agentes activadores de la adenilato ciclasa (AC), tales como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o glucagón. Además, inhibe la absorción intestinal de Ca^{2+} , carbohidratos, aminoácidos y triglicéridos (Patel y Reichlin, 1978). Por otro lado, se ha comprobado el efecto antisecretor de la SST sobre la grelina (Barkan y col., 2003). En el **páncreas**, la SST se sintetiza en las células δ y produce una supresión de la síntesis y secreción de la insulina y el glucagón así como del polipéptido pancreático (German y col., 1990, Ballian y col., 2006).

En el **sistema inmunológico**, la SST tiene diferentes efectos moduladores. Los estudios *in vitro* de Van Hagen (van Hagen y col., 1994) con linfocitos aislados de tejidos mostraron que la SST es capaz de inhibir su proliferación (ten Bokum y col., 2000) y que ejerce un efecto directo sobre las células T, más concretamente, en la secreción de citoquinas proinflamatorias. Estudios en células mononucleares aisladas de sangre periférica de humanos han mostrado que la SST disminuye la secreción de $\text{IFN-}\gamma$ (Muscettola y Grasso, 1990). Por otro lado, la SST refuerza, de una manera dosis-dependiente, la secreción de IL-2 por parte de células mononucleares aisladas de intestino humano (Nio y col., 1993, Levite, 1998). La expresión de marcadores activos

en las células T también puede ser modulada por la SST ya que se ha observado un aumento de los niveles de expresión del receptor de IL-2 *in vivo* después de un tratamiento con Octreótido en humanos (Nio y col., 1993, Levite, 1998). Estudios en líneas plasmáticas murinas han revelado que la SST también actúa sobre las células B, reduciendo la secreción de IgA. En monocitos aislados de sangre periférica de humanos y líneas celulares de macrófagos murinos, tanto la SST como su análogo, el Octreótido son capaces de bloquear la quimioatracción de estas células (ten Bokum y col., 2000).

2.5.2. Acciones fisiológicas a nivel cerebral

En el sistema nervioso, la SST funciona como neurotransmisor y neuromodulador, interviniendo en procesos sensoriales, locomotores, funciones autónomas y en la cognición. La SST inhibe la secreción de la dopamina (desde el cerebro medio), de la noradrenalina, la hormona liberadora de tirotropina y la hormona liberadora de corticotropina (desde el hipotálamo).

Como se ha mencionado anteriormente, la SST es capaz de inhibir la secreción basal y estimulada de la hormona de crecimiento (Schwartz y col., 1998) pero no tiene efecto en la liberación de la hormona luteinizante, la hormona estimuladora del folículo, la prolactina o la hormona adenocorticotropina (ACTH) adrenal bajo condiciones fisiológicas normales.

Diversos estudios postulan que la SST ejerce un papel neurotrófico en el desarrollo embrionario del SNC ya que a las 10 semanas de gestación, se ha detectado SST en el hipotálamo de fetos, y se han encontrado niveles elevados de la misma entre la duodécima y decimocuarta semana (Schwartz y col., 1998, Yew y col., 1999).

A nivel sensorial, los datos sugieren que en mamíferos, la SST ejerce múltiples acciones en las neuronas y en la fisiología de la retina. La SST actúa como un factor positivo regulando la homeostasis y protege a las neuronas frente a daño por isquemia (Mastrodimou y col., 2005). Por otro lado, estudios experimentales de retinopatía diabética en ratas tratadas con SST muestran que este péptido previene la neurodegeneración retinal (Hernández y col., 2013).

Los recientes hallazgos en las interneuronas somatostatinérgicas del bulbo olfatorio han mostrado que la SST modula los procesos de discriminación de olores en ratones (Lepousez y col., 2010).

Por otro lado, está bien establecida la implicación de la SST en las diferentes etapas del procesamiento de la información, en la memoria y el aprendizaje (Bollók y col., 1983, Vécsei y col., 1983). La administración intracerebroventricular de SST induce un aumento de la memoria en ratas, mientras que la depleción de la misma con cisteamina produce una deficiencia en la memoria, no sólo en el momento puntual de la administración, sino también en las cuatro horas posteriores, lo que sugiere que la SST juega un papel importante en la consolidación de los procesos de memoria (Vécsei y col., 1990, Vécsei y Widerlöv, 1990). En el giro dentado del hipocampo, la SST junto con la cortistatina modulan la potenciación a largo plazo (LTP), un proceso celular involucrado en la memoria y el aprendizaje. La SST inhibe la LTP a través de la inhibición de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje de las células dendríticas del giro dentado (Baratta y col., 2002).

Un estudio reciente demuestra que la SST también ejerce efectos tanto en el control de la emoción como en la ansiedad (Butler y col., 2012). Así, estudios histológicos han mostrado que la SST y sus receptores están fuertemente expresados en los núcleos de la amígdala, estructura principal del cerebro involucrada en las emociones (Schumann y col., 2011). Además, la SST tiene efectos ansiolíticos y antidepresivos relacionados con la supresión de la frecuencia theta hipocampal, un efecto similar a los ansiolíticos clásicos como las benzodiazepinas (Engin y col., 2008, Yeung y Treit, 2012).

Por otro lado, la SST regula la actividad motora en ratas (Havlicek y col., 1976). Tashev y colaboradores mostraron que la SST modula la locomoción de una manera bifásica (Tashev y col., 2001), de modo que la administración de SST en el estriado produce inicialmente una disminución de dicha función y, posteriormente, un aumento (Allen y col., 2003). Estudios en diferentes líneas de ratones transgénicos han demostrado que el papel de la SST sobre la locomoción parece ser un control motor fino (Viollet y col., 2000).

La SST y sus receptores se han detectado en diferentes núcleos de la medula oblongata que controla funciones autónomas como la digestión, el ritmo cardíaco y la respiración. En el complejo preBötzinger (preBötC), un componente crítico en la generación del ritmo cardíaco, la SST es expresada por un subgrupo de neuronas glutamatérgicas con actividad rítmica. El silenciamiento agudo de las neuronas

somatostatinérgicas en el núcleo preBötC incrementa el ritmo respiratorio, permitiendo la persistencia de la apnea (Tan y col., 2008). Así, se ha demostrado que la SST ejerce un efecto de control inhibitorio tónico de las neuronas rítmogénicas con el fin de evitar efectos deletéreos (Martel y col., 2012, Wei y col., 2012).

La SST, al igual que otros neuropéptidos, puede modular la excitabilidad en el SNC por mecanismos presinápticos. En el hipocampo y en la corteza cerebral de ratas, la SST induce la inhibición presináptica de la neurotransmisión excitatoria, permitiendo una disminución de la concentración de glutamato y de la amplitud de la respuesta sináptica evocada. La disminución de la concentración de glutamato inducida por SST se debe a la inhibición de la vía de transmisión excitatoria de las proteínas G. La SST también puede producir una inhibición de los canales de Ca^{2+} en el giro dentado.

2.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA

La SST ejerce sus acciones biológicas a través de la interacción con receptores específicos presentes en la membrana plasmática. Los receptores de SST (SSTR) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G o GPCR. Los SSTR se acoplan a diversos efectores como la AC, canales de Ca^{2+} y de K^{+} , fosfotirosina fosfatasas (PTP), proteínas quinasas activadas por mitógeno o MAPK, fosfolipasa A_2 , fosfolipasa C y la bomba de $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ mediante proteínas G inhibitorias (Gi) (Patel y col., 1990).

2.6.1. Receptores de somatostatina

Los SSTR de alta afinidad se describieron por primera vez en 1978 en membranas plasmáticas usando una línea celular de pituitaria de rata, las células GH_4C_1 . Desde el principio, se pensó que debían de existir diferentes clases de SSTR en base a las distintas afinidades por los dos ligandos bioactivos en el cerebro, la hipófisis y los islotes de Langerhans. Entre 1992 y 1993, se identificaron cinco subtipos de SSTR, denominados SSTR1-SSTR5, por medio de técnicas de clonación de genes. Estos subtipos se encuentran codificados por genes distintos localizados en cromosomas diferentes, y en muchos órganos se expresan de manera única o junto con otros receptores de la misma familia.

Los primeros SSTR en ser clonados fueron los subtipos SSTR1 y SSTR2 de ratón y de humano por el grupo de Yamada en 1992 (Yamada y col., 1992a). Este grupo

encontró que ambos SSTRs comparten un 70% de homología en rata. Posteriormente, se clonó el SSTR3 (Yamada y col., 1992b, Corness y col., 1993), que posee un 62% de homología con el SSTR1 y un 64% de homología con el SSTR2. El SSTR4 fue clonado por Rohrer (Rohrer y col., 1993), el cual descubrió que este subtipo comparte un 58%, 43% y 41% de homología con SSTR1, SSTR2 y SSTR3 de humano, respectivamente. Por último, el SSTR5 fue clonado por Panetta (Panetta y col., 1994) y tras estudios de secuenciación, se comprobó que poseía una similitud del 42% con SSTR1, un 48% de similitud con SSTR2, 47% de similitud respecto al SSTR3 y un 46% con el SSTR4 (Bruno y col., 1992, Corness y col., 1993, Demchyshyn y col., 1993, Panetta y col., 1994, Møller y col., 2003).

Los GPCR se dividen en tres familias distintas: A (de tipo rodopsina), B (de tipo secretina y C (de tipo glutamatérgica). En base a sus secuencias, los SSTR pertenecen a la familia A, junto con los receptores adrenérgicos. Estructuralmente, poseen siete dominios transmembrana hidrofóbicos plegados en α -hélice, de 20 a 25 aminoácidos de longitud, separados por bucles extra e intracelulares de residuos hidrofílicos, una secuencia N-terminal extracelular y una secuencia C-terminal intracelular (**Figura 18**). Los SSTR poseen alrededor de 356-391 aminoácidos; la mayoría de las diferencias se encuentran en los aminoácidos de la región C-terminal (Reisine y Bell, 1995a, Patel y col., 1996, Patel y col., 1997).

El motivo más conservado es la secuencia YANSCANPI/VLY, localizada en el séptimo dominio transmembrana, lo que constituye una señal de identidad de estos receptores. Poseen, además, entre una y cuatro secuencias consenso de glicosilación asociadas a asparagina localizadas en el extremo amino-terminal y en el segundo bucle extracelular (Kumar y Grant, 2010). Por otro lado, los SSTR presentan varios sitios potenciales de fosforilación por la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC) o la calmodulina quinasa II, identificados en el extremo C-terminal y en el segundo y tercer bucle intracelular, lo que indica que estos receptores pueden ser regulados mediante fosforilación en determinados residuos de dichos dominios. Además, todos los SSTRs, excepto el SSTR3, poseen un tercer bucle intracelular entre los segmentos transmembrana quinto y sexto que parece intervenir en el acoplamiento a las proteínas G_i , así como un residuo de cisteína tras el séptimo dominio transmembrana. A este dominio se le puede unir ácido palmítico, anclando esta región a

la membrana plasmática y creando así un cuarto bucle citoplasmático. El hecho de que el SSTR3 no posea este dominio puede ser la explicación de sus propiedades de señalización (Puebla y col., 1999, Sharma y col., 1999).

Recientemente, se han encontrado en humanos dos isoformas truncadas del SSTR5 en tejidos normales así como en células tumorales de pituitaria. Éstas presentan cuatro o cinco dominios transmembrana y se denominan SSTR5-TMD4 y SSTR5-TMD5 respectivamente. Ambas isoformas conservan tanto el dominio N-terminal como el motivo de unión a las proteínas G, que se encuentra en el tercer dominio transmembrana, pero presentan un dominio C-terminal distinto al SSTR5 canónico. El análisis de la localización de estos receptores en células CHO-K1transfectadas demuestra que ambas isoformas presentan una distribución distinta al SSTR5 de siete pasos transmembrana, localizándose preferentemente en compartimentos intracelulares (Durán-Prado y col., 2009).

Los SSTRs se unen con alta afinidad, del orden de nanomolar, a la SST, aunque en humanos existe diferente grado de afinidad entre los distintos SSTR y la SST-14 (Hofland y col., 2010). Por otro lado, se ha observado que los SSTR presentan diferentes afinidades frente a los análogos de SST. En pituitaria por ejemplo, se ha observado que el Octreótido y el Lanreótido se unen con alta afinidad al SSTR2 y con muy baja afinidad al SSTR1 (O'Carroll y col., 1992, O'Carroll y col., 1994, Shimon, 2003).

mediante un procesamiento alternativo (Baumeister y Meyerhof, 2000, Stengel y col., 2013).

El gen que codifica para el SSTR5 también presenta dos intrones. En humanos, este gen da origen a dos isoformas de 4 o 5 pasos transmembrana el SSTR5-TMD4 y SSTR5-TMD5, respectivamente como se ha comentado anteriormente. Estas formas truncadas del SSTR5 no se forman por un splicing alternativo clásico. Por otra parte, el SSTR3 de rata contiene dos intrones en la región 5' terminal no traducida (5' UTR).

La caracterización de las regiones promotoras de los genes de SSTR han demostrado que no presentan los clásicos elementos TATA y CAAT (Olias y col., 2004). Además, la presencia de intrones en la región 5' no traducida en los genes de los receptores SSTR1, SSTR2, SSTR3 y SSTR5 permite el uso de promotores alternativos.

Los estudios del gen del SSTR1 de rata ha demostraron que 2 kpb aguas arriba del codón de inicio, existe un promotor compuesto por varios elementos: un silenciador en células de pituitaria, que no aparece en células pancreáticas, y un potenciador localizado entre 324 pb y el punto de inicio de la transcripción. En ambas regiones, se han identificado diferentes sitios de unión para el factor de transcripción específico de pituitaria 1 (Pit-1) (Hauser y col., 1994). Este factor Pit-1 juega un papel importante en la regulación de la secreción de GH, regulando la actividad tanto del gen de la somatotropina como de sus receptores en células somatotróficas (Baumeister y Meyerhof, 2000, Møller y col., 2003, Olias y col., 2004). También se han encontrado elementos de unión a Pit-1 en los genes de SSTR2, SSTR3 y SSTR5 (**Figura 19**).

En el gen del SSTR2, se han identificado tres promotores, P1, P2 y P3. El P1 se encuentra únicamente activo en las células AtT20, y contiene un elemento de unión YinYang 1 que podría mediar como represor de la transcripción del gen y, de este modo, ser responsable de la especificidad celular. En el P2, se han encontrado elementos de respuesta a AMPc (CRE) y elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), lo que probablemente explique que la expresión del gen este regulada por el metabolismo. En el P3, se ha encontrado un elemento de respuesta a TGF- β así como motivos SP1 y cajas CAGA que actúan como transactivadores de TGF- β (Greenwood y col., 1995). En humanos, hay un elemento iniciador, SSTR2inr, que contiene un motivo de caja E. La actividad transcripcional de este elemento depende de la presencia del factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico SEF-2, el cual recluta el FTIIB en el

iniciador (Pscherer y col., 1996, Møller y col., 2003). Por otro lado, el grupo de investigación de Xu identificó en el gen del SSTR2 un elemento de respuesta al 17β -estradiol dependiente de dosis y de tiempo en líneas celulares T47D de cáncer de mama que expresan dicho receptor (Xu y col., 1998).

Los genes de SSTR3, SSTR4 y SSTR5 poseen multitud de dupletes GC repetitivos y cajas E, que son motivos iniciadores localizados normalmente en promotores que no presentan cajas TATA (Xu y col., 1995, Kumar, 2005).

Los genes de los cinco SSTR presentan sitios de unión a factores de transcripción tipo AP-1, AP-2, AP-3, CGF y SP-1. Los sitios AP-1 y AP-2 les confieren un elemento de respuesta a AMPc al margen del elemento de CRE (Greenwood y col., 1997, Møller y col., 2003). Por otro lado, se han identificado elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en los genes del SSTR1 y SSTR5 (Kraus y col., 2000) y un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) en el gen del SSTR1, SSTR3 y SSTR5 (Olias y col., 2004).

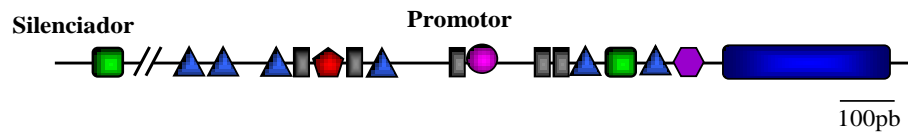
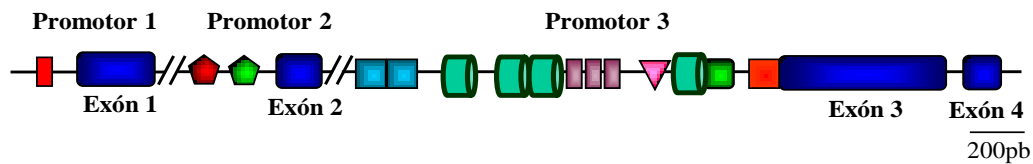
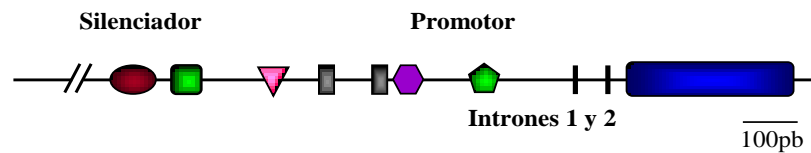
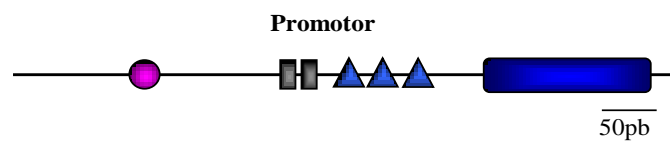
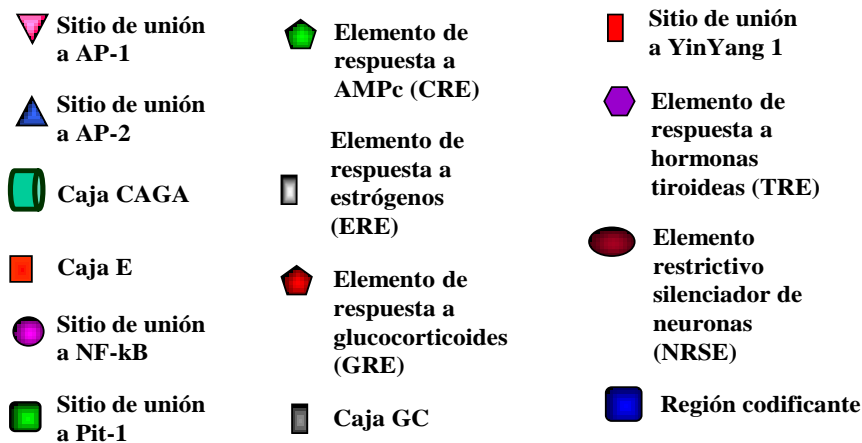
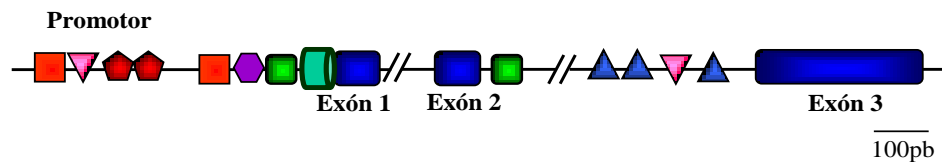
GEN DEL SSTR1 DE RATA**GEN DEL SSTR2 DE RATÓN****GEN DEL SSTR3 DE RATA****GEN DEL SSTR4 DE RATA****GEN DEL SSTR5 DE RATÓN**

Figura 19: Regiones flanqueantes de los genes de receptores de somatostatina en rata.

2.7. REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

2.7.1. Regulación de los SSTR a nivel del gen

Las hormonas ejercen un papel importante en la regulación génica de los SSTR. Así, estudios *in vitro* e *in vivo* de células de pituitaria de rata han demostrado que los estrógenos promueven la transcripción del SSTR2 y SSTR3. También, en pituitaria de rata, la transcripción del SSTR1 está favorecida tanto por estrógenos como por testosterona al contrario que la del SSTR5, cuyos niveles disminuyen en respuesta a dichas hormonas. En líneas de cáncer de mama, como T47D y MCF-7, se ha observado que los estrógenos fomentan la transcripción del SSTR2. En cambio, en la línea celular ZR75-1, los estrógenos producen una disminución del ARNm de SSTR5. Este efecto de los estrógenos sobre la transcripción del SSTR2 se debe, al menos en parte, al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) presente en su secuencia (Kumar y Grant, 2010).

Los glucocorticoides favorecen la transcripción del SSTR2 bajo tratamientos con dexametasona, en parte inducido por el elemento GRE presentes en el segundo promotor del gen.

Por otro lado, en estudios de privación de alimentos así como en modelos animales de diabetes en rata, se ha mostrado que los niveles de ARNm del SSTR1, SSTR2 y SSTR3 en pituitaria y del SSTR5 en hipotálamo están disminuidos (Bruno y col., 1994).

Las hormonas tiroideas también parecen estar implicadas en la regulación de la transcripción de los SSTR ya que en líneas tumorales de tiroides que presentan niveles indetectables de SSTR, el tratamiento con hormonas tiroideas induce la expresión de los genes del SSTR1 y del SSTR5 (Olias y col., 2004).

2.7.2. Regulación dependiente de agonista

Un importante mecanismo de regulación de los SSTR es mediante la desensibilización homóloga por agonista. A excepción del SSTR4, se sabe que los SSTR se internalizan *in vivo* e *in vitro* tras su estimulación con el agonista (Csaba y col., 2012). Al igual que otros GPCR, la fosforilación juega un papel importante en dicha desensibilización. Hasta mediados de 1980, se creía que esta fosforilación era llevada a cabo únicamente por proteínas quinasas dependientes de segundo mensajero,

como la PKA o la PKC. No fue hasta 1986 cuando se identificó una proteína quinasa capaz de unirse a los receptores beta adrenérgicos cuando éstos estaban ocupados por agonista. Estas proteínas se denominaron posteriormente proteínas quinasas de los GPCR (GRK), las cuales marcaron un nuevo punto de partida en la biología de los GPCR. Estas quinasas son una familia de proteínas con siete isoformas denominadas GRK1-GRK7. Estudios de hibridación *in situ* han demostrado que las isoformas GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 son las mayoritarias en el cerebro.

La fosforilación de los SSTR se realiza en residuos de serina y/o treonina. La mayoría de los sitios potenciales de fosforilación se encuentran en la región C-terminal de los SSTR, a excepción del SSTR5 que presenta un punto de fosforilación en el tercer bucle intracelular. Tras la fosforilación, se induce el reclutamiento de unas proteínas denominadas β -arrestinas (que constan de dos isoformas, β -arrestina-1 y β -arrestina-2), dando lugar a un complejo SSTR fosforilado/ β -arrestina. Dicho complejo favorece, a su vez, la unión del complejo de proteínas adaptadoras (AP2) y de la clatrina, produciéndose así la internalización del SSTR y su desacoplamiento de las proteínas Gi (**Figura 20**).

Una vez internalizados, los SSTR pueden seguir diferentes caminos. Por un lado, pueden seguir un ciclo de internalización de corto término en el cual vuelven a la membrana plasmática. Por otro lado, pueden degradarse vía lisosoma o seguir un ciclo de internalización de largo término en el cual viajarán al aparato de Golgi, donde pueden sufrir diferentes modificaciones bioquímicas, como son la glicosilación y palmitoilación. También pueden interactuar con otras proteínas tales como chaperonas, con metiltransferasas como Skb1Hs, que facilitan la localización del SSTR en la membrana plasmática, o con proteínas de andamio como Shank2, que estabiliza el receptor en la membrana (**Figura 20**).

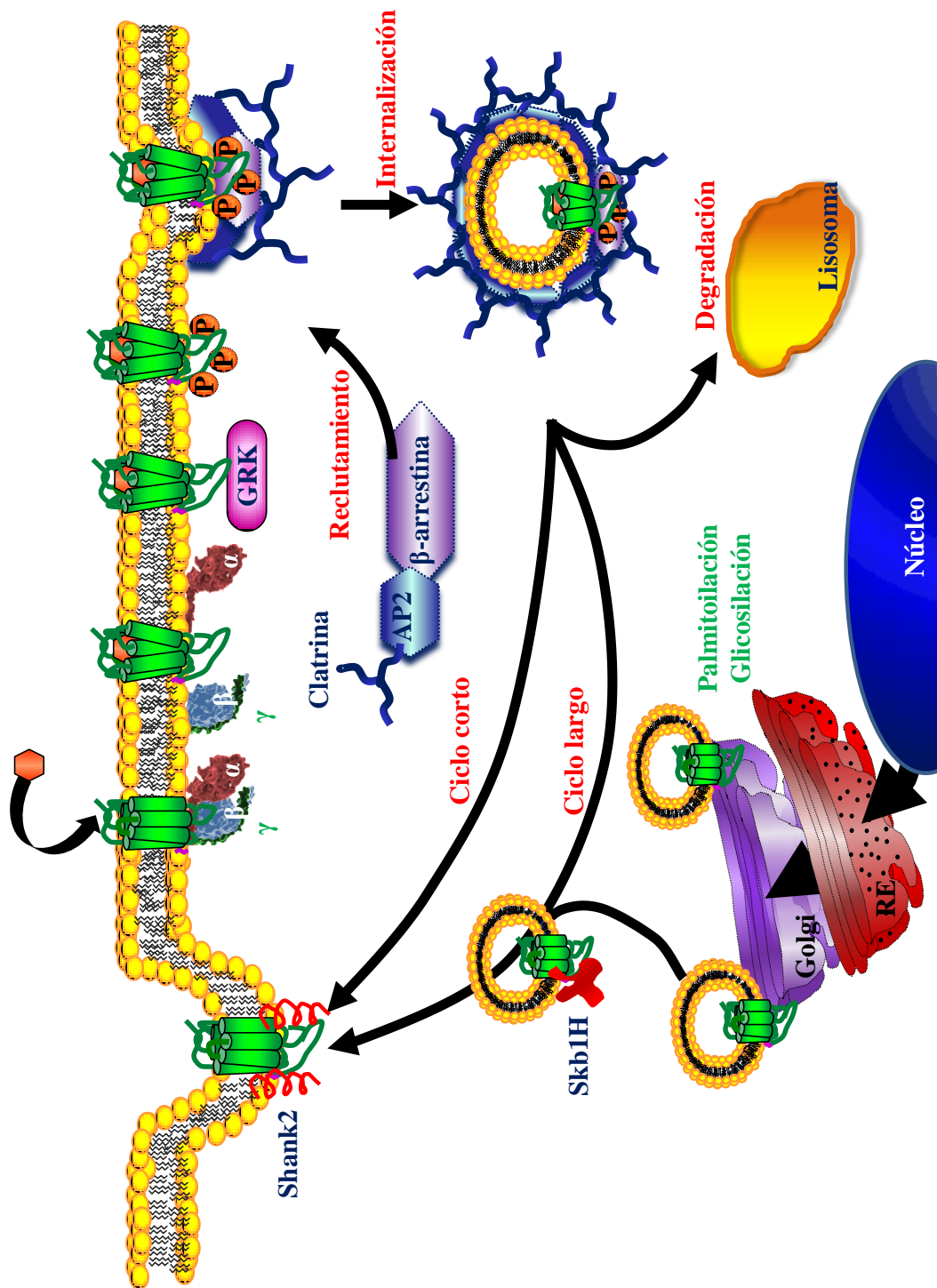


Figura 20: Mecanismo de internalización y recirculación de los SS2R

2.7.3. Dimerización de los receptores de SST

Otro mecanismo de regulación de los SSTR podría ser a través de la dimerización. Así, se ha demostrado que los SSTR pueden permanecer como monómeros o como dímeros, homodímeros o heterodímeros, para unir el ligando, aunque la dimerización no es un mecanismo necesario para su activación (Kumar, 2011) (**Figura 21**).

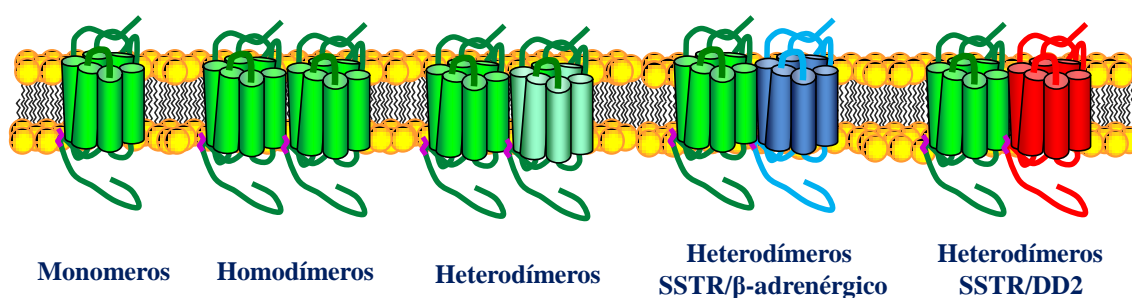


Figura 21: Dimerización de receptores

2.7.4. Homodimerización de los SSTR

En el año 2000, Rocheville (Rocheville y col., 2000b) demostró que algunos SSTR podían dimerizar. Utilizando combinaciones farmacológicas, técnicas biofísicas y bioquímicas, se demostró que el SSTR5 se encuentra inicialmente como monómero y que después de tratarlo con el agonista, es capaz de dimerizar de una manera dosis-dependiente (Rocheville y col., 2000b). Estudios posteriores revelaron que el SSTR1 es el único subtipo de SSTR que se mantiene como monómero tras la unión al ligando (Grant y col., 2004). En células HEK-29, en humanos, así como en cerdos, se detectó que el SSTR2 existe como homodímero en condiciones normales mientras que se disocia a monómero en presencia del ligando; esto parece ser un prerequisite necesario para su internalización (Durán-Prado y col., 2007). El SSTR3, en condiciones normales, existe como homodímero en la superficie celular mientras que disminuye la homodimerización en respuesta al agonista (War y col., 2011). Los estudios de Somvanshi sobre el SSTR4 muestran que este receptor se encuentra como homodímero

en condiciones basales y que la dimerización aumenta en presencia del ligando (Somvanshi y col., 2009).

2.7.5. Heterodimerización de los SSTR

La presencia de diversos receptores en una misma célula, como ocurre en las células neuronales, en la pituitaria o en el páncreas, hizo sospechar que los SSTR podrían también formar heterodímeros. Estudios de los SSTR han demostrado que son capaces de heterodimerizar con otros subtipo de SSTR, así como con otros GPCR, tales como los receptores de opiáceos, adrenérgicos y dopaminérgicos (Baragli y col., 2007, Somvanshi y col., 2009, Kharmate y col., 2011, Somvanshi y col., 2011a).

2.7.6. Heterodimerización de la familia de SSTR

En rata, se ha observado que los receptores SSTR2 y SSTR3 son capaces de heterodimerizar y que la funcionalidad de este dímero es similar a la del SSTR2. El SSTR2 también puede dimerizar con el SSTR5 inducido por el agonista. Rocheville descubrió la existencia del dímero SSTR1/SSTR5 en cultivos celulares y observó que el comportamiento de estos receptores, al dimerizar, cambiaba. Así, cuando el SSTR1 se encuentra solo, es resistente a la internalización en presencia del agonista y, además, es capaz de aumentar su densidad en la superficie celular. Por el contrario, cuando dimeriza con el SSTR5, presenta una internalización dependiente de agonista. Hay autores que han descrito la dimerización del SSTR4 con el SSTR5, lo que modifica las vías de señalización del SSTR4 relacionadas con la proliferación celular (Somvanshi y col., 2009). El extremo C-terminal juega un papel importante tanto en la internalización como en la dimerización de los SSTR (Somvanshi y col., 2009, Kumar, 2011).

2.7.7. Heterodimerización de los SSTR con receptores opiáceos

Se ha demostrado que el SSTR2 es capaz de heterodimerizar con los receptores μ de opiáceos (MOR1) cuando ambos se coexpresan en células HEK-293. Esta dimerización no parece alterar las propiedades de señalización de los receptores, aunque sí se ha observado que el tratamiento de estas células con el ligando para SSTR2 promueve la fosforilación, desensibilización y endocitosis de ambos receptores. En cambio, se ha visto que si se tratan con el ligando específico de MOR1, se produce una

fosforilación y desensibilización de ambos receptores, pero no la internalización del SSTR2 (Pfeiffer y col., 2002).

2.7.8. Heterodimerización de los SSTR con receptores dopaminérgicos

Los primeros estudios de heterodimerización de los SSTR y los receptores dopaminérgicos fueron realizados por Rocheville (Rocheville y col., 2000a). Posteriormente, se realizaron estudios de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) en células CHO-K1 que mostraron la dimerización del SSTR5 con el receptor 2 dopaminérgico (D2R). La funcionalidad del complejo SSTR5/D2R es diferente para el SSTR5 y para el D2R. La unión del D2R a su agonista amplifica la afinidad del SSTR a su ligando en un 3000% mientras que la unión del antagonista disminuye en un 80% la afinidad por el péptido. Este aumento y disminución en la afinidad del SSTR por el ligando se traduce en un aumento o disminución en la capacidad de inhibir la actividad de la AC estimulada por forskolina (Rocheville y col., 2000a, Rocheville y col., 2000b, Durán-Prado y col., 2008). También se ha encontrado en humanos una dimerización del SSTR2 y del D2R. Este heterodímero es inducido por la unión del ligando y presenta mayor afinidad por la dopamina. Además, conduce a un incremento en la vía de señalización del D2R y un aumento en la internalización del SSTR2 (Rocheville y col., 2000a, Ferone y col., 2009, Ferone, 2010, Gatto y Hofland, 2011).

2.7.9. Heterodimerización de los SSTR con receptores adrenérgicos

Hay varios estudios sobre la heterodimerización de los SSTR y los receptores adrenérgicos (AR), concretamente con los receptores adrenérgicos β_1 (β_1 AR) y β_2 (β_2 AR) (Somvanshi y col., 2011a). Dichos estudios muestran que estos heterodímeros existen en condiciones basales y que la regulación del tráfico de estos receptores acoplados a la AC y, por tanto, las cascadas de señalización de dichos receptores es dependiente del tiempo. Los estudios realizados en líneas transfectadas con β_1 AR/SSTR5 y con β_2 AR/SSTR5 muestran que existen diferencias en la regulación de las vías de señalización. Por un lado, en las líneas celulares transfectadas con β_1 AR/SSTR5, la regulación predominante de las vías de señalización es la que realiza el

SSTR5. En cambio, en las líneas transfectadas con β_2 AR/SSTR5, el efecto del SSTR5 es sinérgico junto con el β_2 AR (Somvanshi y col., 2011a, Somvanshi y col., 2011b).

2.8. DISTRIBUCIÓN DE LOS SSTRS

Empleando técnicas de unión de ligando a receptor, crosslinking, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica y purificación de receptores solubilizados, se ha demostrado que los SSTR se encuentran, en diferentes proporciones, en el cerebro, el intestino, la pituitaria, el tiroides, la glándula adrenal, el páncreas endocrino y exocrino, el riñón y las células inmunes (Patel y col., 1995, Reisine y Bell, 1995a, b, Patel, 1999). Diversas líneas tumorales también son ricas en SSTR, como son la línea tumoral de pituitaria AtT-20 de ratón, las líneas de cáncer de páncreas Mia PaCa, líneas de glioma, leucemia y mieloma (Patel y col., 1995, Meyerhof, 1998, Puebla y col., 1999).

Estudios de ARNm en roedores y en humanos han demostrado que los distintos subtipos de SSTRs no se expresan de la misma manera en todos los tejidos. El SSTR1 es muy abundante a lo largo del eje neural. Mediante el empleo de sondas de ADN, se ha observado que en cerebro de rata, hay altos niveles de ARNm de este subtipo en el hipocampo, hipotálamo, corteza y amígdala (Pelletier y col., 1975, Pérez y col., 1994, Raulf y col., 1994). En los órganos periféricos, también se ha detectado expresión del SSTR1, aunque en menor medida, principalmente en la pituitaria, islotes de Langerhans, bazo y glándulas adrenales.

El ARNm del SSTR2 fue detectado por el grupo de Patel (Patel y col., 1993) en ratón, rata y humanos. Este subtipo es el más abundante en el SNC, con un patrón de distribución similar al SSTR1, aunque el SSTR2 es el más expresado en la corteza, concretamente en las capas V-VI de la corteza cerebral, en el núcleo endopiriforme, locus cerúleo, habénula media, subículo, capa granular del giro dentado, el estriado y la amígdala (Pérez y col., 1994). En los órganos periféricos, el SSTR2 se expresa en la pituitaria, islotes de Langerhans, bazo y glándulas adrenales (Raulf y col., 1994).

El SSTR3 es el subtipo mayoritario en el cerebelo de rata (Bruno y col., 1993) y se expresa de manera moderada en el resto del cerebro. En los tejidos periféricos, el SSTR3 se expresa principalmente en el hígado y en el bazo (Yamada y col., 1992b, Bruno y col., 1993, Raulf y col., 1994, Patel, 1999, Fehlmann y col., 2000).

El SSTR4, en comparación con el resto de los SSTR, está poco expresado en el cerebro, destacando su expresión en las capas V y VI de la corteza y en los subcampos CA1 y CA2 del hipocampo (**Figura 22**). En cambio, es el subtipo más abundante en el corazón y se encuentra en concentración moderada en los islotes de Langerhans y en el pulmón (Bruno y col., 1992, Kumar y Grant, 2010). Por último, el SSTR5 predomina en el intestino, en la pituitaria y en los islotes de Langerhans mientras que se expresa de una manera muy difusa en el cerebro. Se han identificado pequeñas concentraciones de ARNm de este SSTR en hipotálamo e hipófisis; también están presentes las variantes del SSTR5, SSTR5-TMD4 y SSTR5-TMD5 en el cerebro.

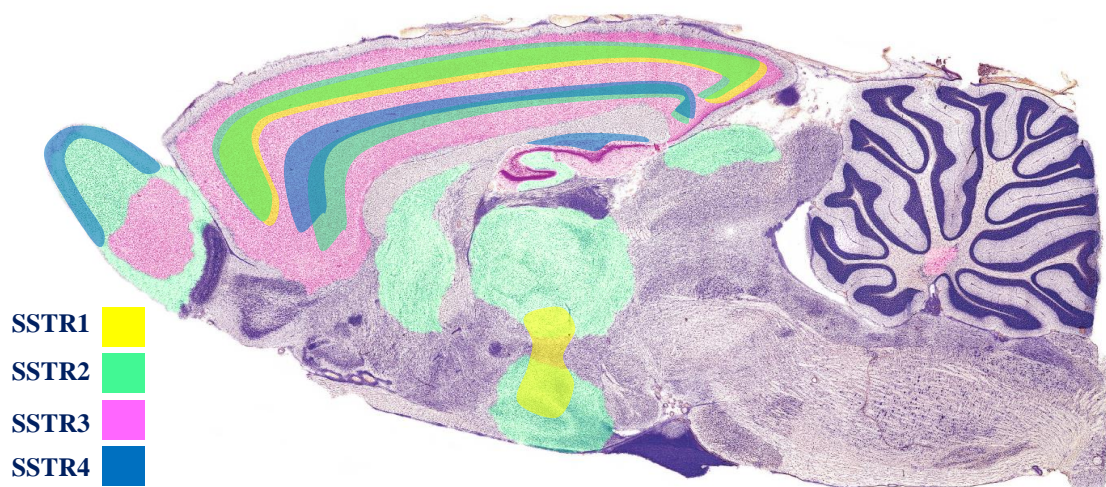


Figura 22: Representación esquemática de la distribución de los receptores de somatostatina en el cerebro de rata.

Tabla 5: Localización de los subtipos de receptores

Tejido	Subtipo de receptor				
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSSTR4	SSTR5
SNC					
Amígdala	+++	+	+++	++	-
Bulbo olfatorio	++	+++	++++	++	-
Cerebelo	++	+	+++	+	-
Corteza	++++	++++	++	++	-
Estriado	+++	+++	++	+	-
Formación hipocampal	++++	+++	+++	++	-
Cuerno de Amón	++	+++	+++	++++	-
Giro dentado	++++	++++	++++	++	-
Ganglio basal	-	-	+	+	-
Hipófisis	++	++	+	+	++
Hipotálamo	+	++	+	+	+++
Tálamo	++	++	++	+	-
Septum	-	+++	+	++	-
Tejidos periféricos					
Bazo	++	+	++++	++	++
Corazón	+	+++	+	++++	++
Estómago	+	+	+	+	-
Glándulas adrenales	+	++++	+	-	-
Intestino	+	-	+	++	++
Islotes de Langerhans	++	++++	+	++	+
Riñón	-	++	+	++	-

2.9. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACOPLADAS A LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

Dada la amplia distribución de la SST, sus funciones son muy variadas aunque se pueden clasificar en dos tipos:

- Efectos inhibitorios de la secreción
- Efectos inhibitorios de la proliferación celular

Los sistemas efectores implicados en las acciones antisecretoras de la SST incluyen:

- Inhibición de la enzima AC
- Estimulación de los canales de K^+ dependientes de voltaje
- Inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
- Inhibición de la exocitosis mediado por el acoplamiento de los SSTR a vesículas de secreción

En la inhibición de la proliferación celular mediada por la SST, están implicados los siguientes efectores:

- Inhibición de la bomba de Na^+/H^+
- Estimulación de las fosfotirosina fosfatasas (PTP)
- Regulación de las MAPK

Acoplamiento de los SSTR a sus efectores

Los SSTR inducen sus respuestas celulares a través de la modulación de múltiples sistemas efectores. En la mayoría de los casos, dichos receptores se acoplan a sus efectores moleculares a través de proteínas G.

2.9.1. Proteínas G

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas constituidas por una subunidad α ($G\alpha$) con actividad GTPasa, una subunidad β ($G\beta$) y una subunidad γ ($G\gamma$), que se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana plasmática (Gilman, 1987). Las proteínas G se clasifican normalmente atendiendo a su función. Así, existen las proteínas G_s (estimuladoras de la AC), $G_{i/o}$ (inhibidoras de la AC y activadoras de canales de potasio), G_q (activadoras de la fosfolipasa $C\beta$) y G_{12} (activadoras de Rho) (Kumar y Grant, 2010). Hasta la fecha, se han identificado cinco isoformas de la

subunidad β y doce isoformas de la subunidad γ (Schwindinger y Robishaw, 2001, Offermanns, 2003). Generalmente, las subunidades β y γ forman un heterodímero al que se une la subunidad α fuertemente cuando lleva unido GDP (Simon y col., 1991).

El sitio de unión de nucleótidos de guanina se encuentra en la subunidad G_α . La sustitución de GDP por GTP, después de la interacción de G_α con un GPCR activado, causa un cambio en la conformación de dicha subunidad. En su conformación unida a GTP, la subunidad G_α tiene una baja afinidad por $G_{\beta\gamma}$, por lo que se disocia del complejo. Una vez separadas, ambas partes de la proteína G son capaces de interaccionar con distintos efectores celulares. Posteriormente, se vuelven a asociar. Para ello, la subunidad α , mediante su actividad GTPasa, hidroliza el GTP a GDP, lo que favorece la unión al complejo β/γ . En la mayoría de los casos, esta actividad esta favorecida por una proteína estimuladora de la actividad GTPasa (GAP, en inglés).

Empleando diferentes técnicas de inmunoneutralización, inmunoprecipitación y purificación por afinidad, se ha determinado que los cinco SSTR se acoplan a proteínas G sensibles a la toxina *pertusis* como son $G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$, $G_{i\alpha3}$ y $G_{o\alpha}$ (Law y col., 1991). Se ha observado, además, que un mismo subtipo de SSTR es capaz de acoplarse a sus efectores a través de diferentes proteínas G (**Tabla 6**) (Csaba y Dournaud, 2001, Møller y col., 2003, Lahlou y col., 2004).

Tabla 6: Proteínas G que se acoplan a cada subtipo de SSTR

Subtipo de receptor	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Proteína G	$G_{i\alpha1}$	$G_{i\alpha1-3}$	$G_{i\alpha1}$	Se desconoce	$G_{i\alpha1-3}$
	$G_{i\alpha2}$	$G_{o\alpha}$	$G_{i\alpha3}$		$G_{i\alpha12}$
	$G_{i\alpha3}$	$G_{q\alpha}$	$G_{q\alpha}$		$G_{q\alpha}$

2.9.1. Vías implicadas en la inhibición de la secreción celular

2.9.1.1. Adenilato ciclasa

La AC es una enzima que convierte el ATP en AMPc. Se han descrito nueve isoformas de AC de membrana (ACm), denominadas ACI-ACIX, y una isoforma soluble, la ACs, que se encuentra en el citosol así como en el núcleo. Las isoformas de

membrana poseen una estructura muy similar, diferenciándose en el extremo N-terminal. Su estructura consta de dos dominios transmembrana de seis pasos cada uno (TM1 y TM2) y dos dominios citoplasmáticos que constituyen los dominios catalíticos (C1 y C2). La isoforma soluble sólo presenta los dominios catalíticos C1 y C2, separados entre sí por un pequeño lazo (Møller y col., 2003, Sassone-Corsi, 2012).

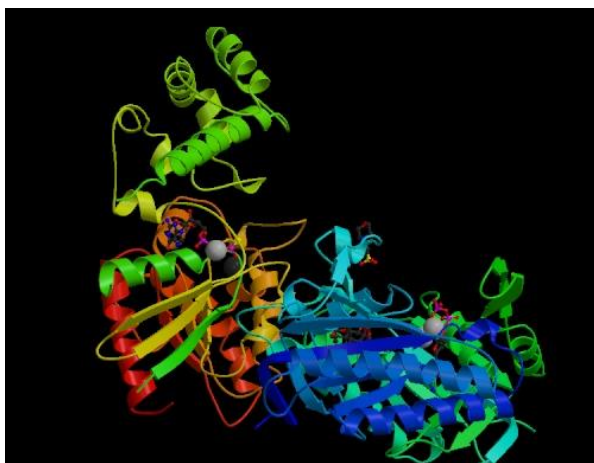


Figura 23: Esquema de la estructura de la adenilato ciclasa (AC) de membrana, asociada a la subunidad α de la proteína G (Imagen tomada de la base de datos RSCB, Protein Data Bank).

La mayoría de las AC, a excepción de la ACs, son activadas por la proteína Gs e inhibidas por las isoformas Gi y Go. Por otro lado, el dímero β/γ puede activar a las isoformas ACII, ACIV y ACVII e inhibir a la ACI y ACVIII (Sunahara y Taussig, 2002).

Los niveles de AMPc generados por la activación de la AC dependen del balance entre la actividad de la AC (que lo produce) y

de la fosfodiesterasa (PDE) (que lo degrada). Ambas enzimas pueden ser reguladas por diversas moléculas como el calcio, la calmodulina, el inositol (a través de la PKC), y receptores de tirosin quinasa (a través de la vía de ERK, MAPK y PKB) (Goraya y Cooper, 2005, Kumar y Grant, 2010).

Existen tres efectores principales del AMPc: la PKA, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) y diversos canales iónicos, lo que le confiere a este segundo mensajero un amplio rango de funciones biológicas en la célula (Sassone-Corsi, 2012). Existe un gran número de proteínas citoplasmáticas y nucleares que se han identificado como sustratos de la PKA. Dicha quinasa interviene, por ejemplo, en la regulación de la síntesis del glucógeno, en la síntesis de lípidos, en la permeabilidad de canales iónicos y también en la regulación transcripcional a través de la fosforilación de los elementos de respuesta al AMPc (CREB).

La AC es uno de los efectores intracelulares más estudiados de la SST. Los primeros trabajos que los relacionan se remontan a la década de los 80, cuando se

observó que la SST inhibía la formación de AMPc en el cerebro. Estudios en diferentes tipos celulares, incluidos neuronas y células gliales de corteza, hipocampo y estriado, revelaron que la SST inhibe tanto la actividad basal como estimulada de la AC a través de sus cinco SSTR y a través de las proteínas G_{i1} , G_{i2} y G_{i3} (Y.C., 1992, Meyerhof, 1998, Olias y col., 2004). Sin embargo, estudios en líneas celulares como COS-7 y CHO-K1, en las que se expresó el SSTR5 de humanos, demostraron que a altas concentraciones de agonista, se produce una activación de la AC (Olias y col., 2004).

2.9.1.2. Canales de potasio

Los canales de K^+ forman parte de una familia de proteínas de membrana que regulan procesos de liberación de neurotransmisores, secreción de insulina, excitabilidad neuronal, transporte de electrolitos, contracción muscular y regulación del volumen celular.

La modulación de los canales de K^+ por la SST y sus receptores ha sido bien caracterizada en diferentes líneas celulares. Estudios en neuronas del locus cerúleo de rata y en neuronas del plexo submucoso de cobaya han revelado que la SST induce la activación de los canales de K^+ rectificadores. Por otro lado, estudios en neuronas piramidales han demostrado que el SSTR2 es el encargado de modular la conductancia de dichos canales.

La SST se acopla a canales de K^+ regulados por voltaje, canales de K^+ regulados por Ca^{2+} y canales de K^+ rectificadores (Kumar y Grant, 2010) a través de las proteínas G_{i2} , G_{i3} y, posiblemente, también a través del complejo β/γ . La acción de la SST a través de estas proteínas G induce la apertura de los canales de K^+ y la salida de iones K^+ del interior celular, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana. Esta movilización de iones, a su vez, impide la entrada de iones de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, conduciendo a un descenso de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Lahlou y col., 2004). La disminución de los niveles de Ca^{2+} conlleva, a su vez, una inhibición de la exocitosis (Theodoropoulou y Stalla, 2013).

La SST también es capaz de modificar la corriente de K^+ indirectamente, a través de la activación de la vía de la fosfolipasa C (PLC)-PKC, (Cheng y col., 2002a, Cheng y col., 2002b) y a través de la vía de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) en la cual la

producción de ácido araquidónico induce la activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} en hipocampo de rata (Olias y col., 2004). Algunos estudios han demostrado que el SSTR1 y el SSTR2 se pueden acoplar de manera negativa a la vía de la PLA_2 /ácido araquidónico en la línea celular GC de pituitaria de rata (Cervia y col., 2002).

2.9.1.3. Canales de calcio

Los canales de calcio son canales iónicos que permiten la entrada de iones Ca^{2+} . Se han descrito seis tipos de canales de Ca^{2+} atendiendo a sus propiedades funcionales, denominados T (transitorio), L (de largo término), N (neuronal), P/Q (Purkinje) y R (residual) (Yang y col., 2012).

La SST induce una disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular no sólo a través de los canales de K^+ , como se ha explicado en el apartado anterior, sino también a través de la inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje vía una proteína G sensible a la toxina pertussis. Los SSTR1, SSTR2 y SSTR5 parecen mediar este efecto ya que utilizando análogos de SST, se ha demostrado que dichos receptores se acoplan de manera negativa a estos canales de Ca^{2+} en células de pituitaria de ratón y en células productoras de insulina 1049-38.

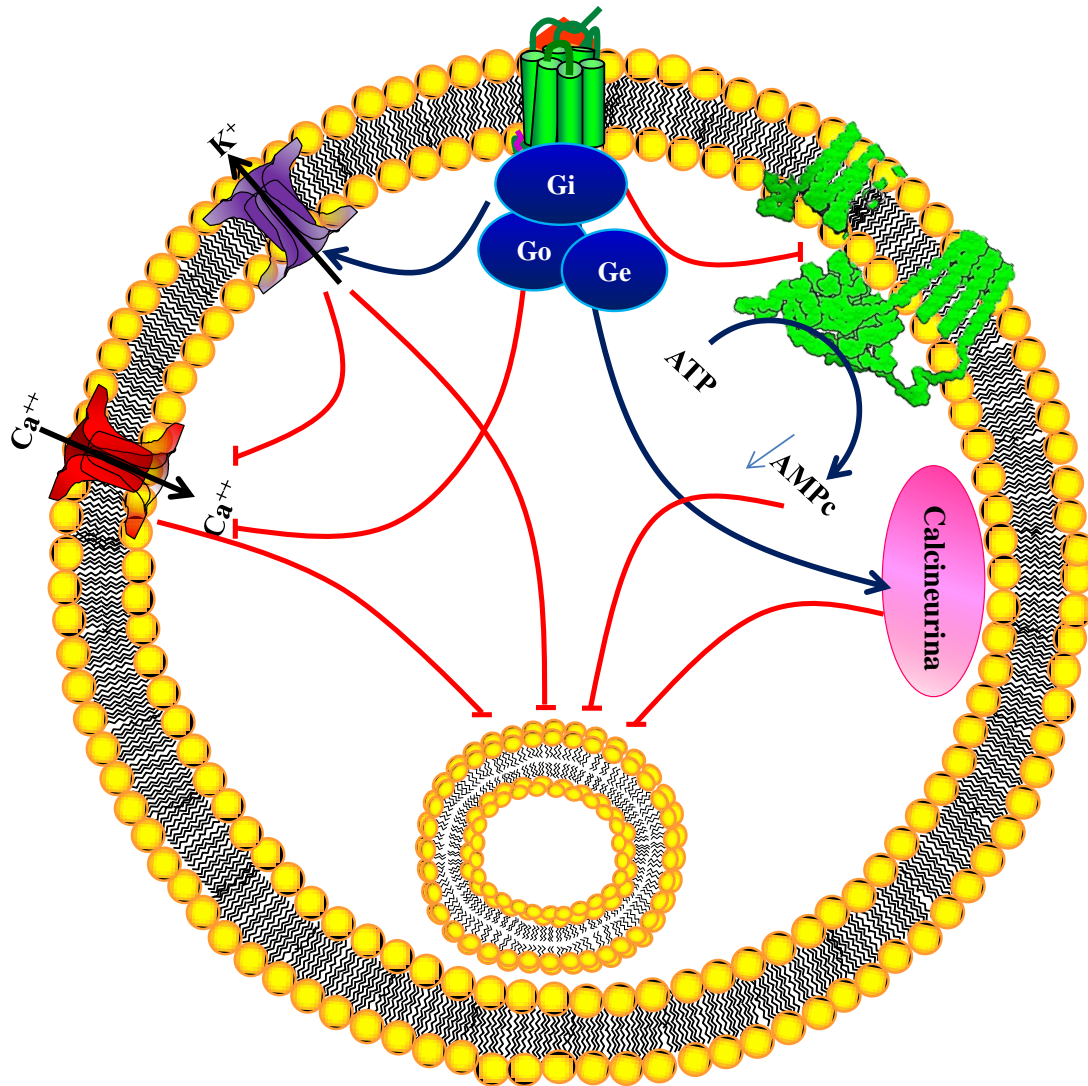
Los SSTR pueden inhibir el flujo de Ca^{2+} a través de la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc en células de ganglioma de ratón. La SST también es capaz de actuar sobre los canales de Ca^{2+} de tipo N, inhibiéndolos a través de la proteína fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina (Zhu y Yakel, 1997). En células GH_4C_1 , los SSTR inhiben dichos canales a través de las proteínas $G_{i\alpha 2}$, $G_{o\alpha}$ y el complejo β/γ (Jeong y Ikeda, 2000). En células GC de pituitaria de rata, se ha detectado una inhibición de los canales de tipo L mediada por la proteína $G_{o\alpha}\beta_1\gamma_3$.

Por otro lado, la unión de la SST a sus receptores también puede inhibir los canales de Ca^{2+} de una manera indirecta mediante la PKA, puesto que se sabe que dicha quinasa es capaz de fosforilar estos canales y activarlos. Dado que la SST induce una disminución de los niveles de AMPc intracelular a través de la inhibición de la AC, lo que conduce a una menor activación de la PKA, el resultado neto es una menor fosforilación de los canales de Ca^{2+} y, por tanto, una inhibición de los mismos (Yang y col., 2012).



2.9.1.4. Vesículas de secreción

Como se ha mencionado anteriormente, la SST es un potente inhibidor de la secreción de prolactina (PRL), GH, TSH, ACTH, así como de la inhibición de la secreción de péptidos intestinales, ácido gástrico y enzimas digestivas del páncreas. El efecto inhibidor de la secreción se debe principalmente a su capacidad de inhibir la exocitosis que, como se ha detallado anteriormente, es mediada por la inhibición de la AC y la disminución en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Theodoropoulou y Stalla, 2013). No obstante, hay estudios en células AtT-20 que demuestran que la SST es capaz de inhibir la secreción de ACTH a través de proteínas G sensibles a PTX de un modo independiente de AMPc, de Ca^{2+} o de cualquier otro segundo mensajero. Por otro lado, en células α pancreáticas, se ha observado que la SST inhibe la secreción de glucagón mediante la activación de la calcineurina (Gromada y col., 2001). Aunque se desconoce el subtipo de SSTR implicado en dicha activación y posterior inhibición de la exocitosis, se ha demostrado que el SSTR2 podría mediar este efecto (Kramer y col., 2005).



2.9.2. Vías de señalización implicadas en la inhibición de la proliferación celular por la SST

2.9.2.1. Bomba de Na^+/H^+

79

independiente de proteínas G, lo que genera una acidificación del medio intracelular (Barber y col., 1987, Hou y col., 1994). Dicha acidificación, a su vez, conduce a la inhibición de serina/treonina quinasas con la consiguiente defosforilación de sus sustratos, implicados en acontecimientos mitogénicos tempranos. Por otro lado, se ha sugerido que el SSTR4 podría estimular la bomba de Na^+/H^+ de una manera dependiente de proteínas Gi/Go sensible a PTX en células CHO (Møller y col., 2003).

2.9.2.2. Fosfotirosina fosfatasas

La activación de las fosfotirosina fosfatasas (PTP) mediada por la SST representa uno de los principales mecanismos intracelulares involucrados en los efectos antiproliferativos de la SST y sus análogos.

Las PTP son proteínas capaces de defosforilar y desactivar otras proteínas, como las tirosina quinasas (PTK), las MAPK e incluso receptores de membrana, como los receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), por lo que intervienen en la regulación, de una manera positiva o negativa, de numerosas actividades celulares.

En humanos, se han identificado 107 tipos distintos de PTP que se clasifican como PTP “clásicas”, con 38 miembros, y PTP “no clásicas”, con 65 miembros. Las formas clásicas, a su vez, incluyen PTP citosólicas y PTP similares a receptor (RPTP). Estructuralmente, las formas clásicas de RPTP constan de una porción extracelular variable similar a la inmunoglobulina o a fibronectina de tipo III, un dominio transmembrana corto y una porción citosólica que presenta dos dominios catalíticos, uno próximo a la membrana plasmática (D1), y otro distal (D2). Las formas citosólicas se caracterizan por tener un único dominio catalítico flanqueado por distintos dominios reguladores, lo que confiere a estas fosfatasas una localización subcelular, restringiendo así su actividad a regiones concretas de la célula (Florio, 2008).

Los SSTR se asocian a PTPs que poseen un dominio SH2 (dominio de homología con la quinasa Src), como son la SHP-1 (PTP1C), SHP-2 (PTP1D) o PTP η (DEP-1). El acoplamiento de los SSTR a las PTP se produce tanto a través de la subunidad α como del dímero β/γ de las proteínas Gi y Go.

La SST, a través de las PTP, bloquea la progresión del ciclo celular, deteniendo a las células en G1/S. Este efecto parece estar mediado por SSTR1 y SSTR2 o, en G2/M, a través del SSTR3 (Theodoropoulou y Stalla, 2013).

En células CHO, se ha demostrado que el SSTR1 induce la parada del ciclo celular a través de SHP-2 (activada por Gi) que defosforila a c-Src (en el sitio inhibidor), permitiendo la fosforilación en el sitio estimulador. Esto permite que c-src active la vía de Raf/MEK/ERK, conduciendo así a la activación de los inhibidores de ciclo celular p21^{cip1} y p27^{kip1}. Por otro lado, en células PC CI3 de tiroides y en glioma el SSTR1, inhibe la proliferación celular mediante una activación prolongada de la PTP η , a través de la vía de las MAPK (Arena y col., 2007, Theodoropoulou y Stalla, 2013).

El efecto antiproliferativo de la SST mediado por SSTR2 en líneas tumorales comienza con la activación de la PTP, SHP-1. Dicha activación puede producirse de diferentes maneras. Por un lado, el SSTR2 está asociado constitutivamente con el dominio SH2 de SHP-1 a través de Gi α 3 y, por otro lado, SHP-1 puede ser activado directamente a través de SHP-2 (el cual también está asociado a SSTR2). Después de la activación de SHP-1 y SHP-2, mediado por SSTR2, se produce la inhibición de la PI3K, lo cual induce la inhibición de la serín treonin quinasa Akt. El resultado final es la activación de la glucógeno sintetasa quinasa 3 β (GSK3 β) y una disminución de la fosforilación de los efectores de mTOR p70/S6k y 4E-BP1 (Theodoropoulou y col., 2006).

El SSTR3, al igual que el SSTR1 y SSTR2, es capaz de activar las PTP. Así, una sobre-expresión de SSTR3 puede activar SHP-2 y, subsecuentemente, inactivar a Raf1.

En los últimos años, se ha identificado una nueva vía de señalización relacionada con la proliferación, diferenciación celular y permeabilidad del endotelio que es la mediada por la óxido nítrico sintasa (NOS). Recientemente, el grupo de Lahlou ha publicado que el SSTR2, a través de la activación de SHP-1, bloquea la NOS, produciendo así una parada del ciclo celular (Lahlou y col., 2004) mientras que el SSTR5 es capaz de inactivar a la NOS mediante la activación de la p60src (Theodoropoulou y Stalla, 2013).

2.9.2.3. Fosfolipasas

El efecto antiproliferativo de la SST no solo se lleva a cabo de manera dependiente de las PTP sino también a través de la activación de distintas fosfolipasas.

Las fosfolipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana. Dependiendo del enlace éster que escinden, se clasifican en diferentes familias: fosfolipasa A (PLA), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD). La PLA y la PLC son las dos principales fosfolipasas que se acoplan a los SSTR. Hasta el momento, se han identificado dos tipos de PLA, la PLA₁ y la PLA₂. Esta última, a su vez, se clasifica como citosólica (PLA_{2c}) y de secreción (PLA_{2s}). Por otro lado, han identificado diez isoformas distintas de PLC (Murthy y col., 1996).

En cultivos celulares de neuronas hipocampales, astrocitos y células del epitelio vascular, la SST puede inducir la estimulación de la PLA₂ y, así, la producción de ácido araquidónico y de leucotrienos. En células CHO-K1, se ha demostrado que el SSTR4, a través de las proteínas G, activa a la MAPK y estas estimulan a la PLA₂ (Møller y col., 2003).

El SSTR2, SSTR3 y SSTR5 se acoplan a la PLC, aunque de manera diferente. En células musculares intestinales, el SSTR2 estimula la PLC a través de G_o mientras que el SSTR3 se acopla a la PLC-β3 a través de la subunidad β/γ de las proteínas G_i y G_o (Murthy y col., 1996). Sin embargo, el SSTR5 se une a dicha enzima a través de la subunidad α de las proteínas G_i o G_q (Murthy y col., 1996, Csaba y Dournaud, 2001, Theodoropoulou y Stalla, 2013). La activación de la PLC produce la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), lo que genera los segundos mensajeros fosfoinositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a sus receptores intracelulares, situados en depósitos de Ca²⁺ no mitocondriales, el retículo endoplásmico, provocando una liberación de Ca²⁺. El DAG, junto con la calmodulina activada por el aumento intracelular del Ca²⁺, activan la PKC que, a su vez, podría activar la bomba de Na⁺/H⁺ (Møller y col., 2003, Reynaert y Geerts, 2003).

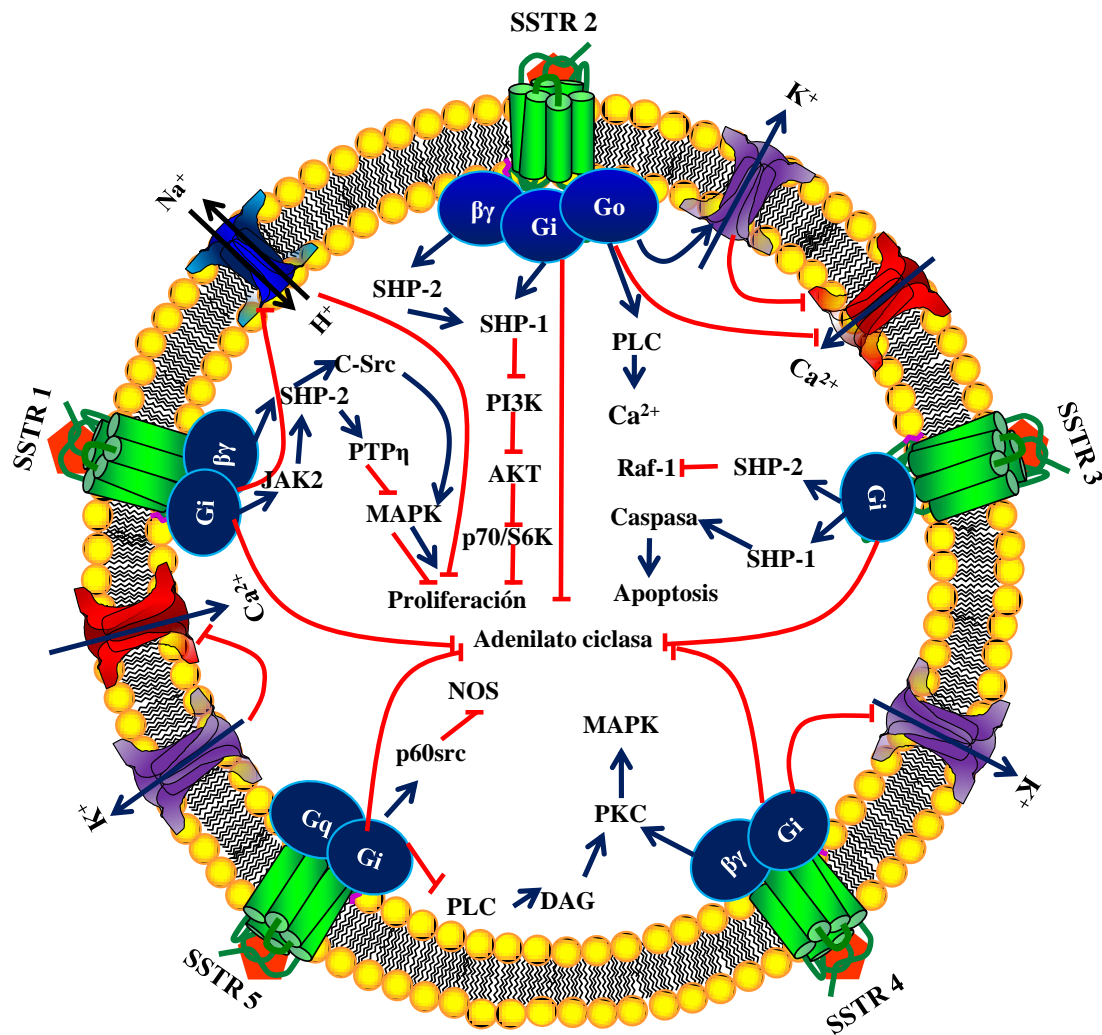


Figura 25: Vías de señalización implicadas en la acción antiproliferativa de la somatostatina.

Objetivos

*“Los objetivos señalan en donde quieres terminar, no en donde te encuentras hoy”
[Catherine Pulsifer]*

OBJETIVOS:

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica desmielinizante del SNC que representa la causa más frecuente de invalidez en el adulto joven (Huang y Rae-Grant, 2009). La patogenia precisa de la EM se desconoce aunque se considera una enfermedad bifásica, con un componente inmunológico y otro degenerativo progresivo. La dificultad motora es la principal alteración encontrada en esta patología aunque, recientemente, se han detectado alteraciones en procesos de cognición y memoria (Amato y col., 2013b).

En el momento actual, no se dispone de una terapia eficaz por lo que en el presente trabajo, se quiso valorar el posible efecto preventivo y/o terapéutico de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina (PEA) dado su papel inmunomodulador y antioxidante, en la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante (EAE-CR), un modelo experimental crónico muy similar a la EM. Asimismo, se quiso profundizar en los mecanismos implicados en las alteraciones de áreas motoras y cognitivas en los tres brotes de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote.

Dada la importancia del sistema receptor-efector de la somatostatina (SST) en los procesos cognitivos y motores y las alteraciones descritas previamente por nuestro grupo en la EAE aguda (Aguado-Llera y col., 2011), el presente estudio también propone valorar la integridad de dicho sistema en el hipocampo de ratas con EAE-CR, así como el efecto de la sal de PEA sobre el mismo.

Por todo ello, en el presente trabajo, nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1. Determinar los niveles de distintas poblaciones linfocitarias en sangre periférica, bazo y parénquima cerebral en ratas con EAE-CR así como el efecto de la sal de PEA sobre dichos niveles, en los tres brotes de la enfermedad.**
- 2. Evaluar las poblaciones linfocitarias y el grado de desmielinización en áreas implicadas en el control del movimiento, como es el cerebelo, y en áreas implicadas en procesos de aprendizaje y memoria, como son el hipocampo y los cuerpos mamilares, así como el efecto de la sal en dichas áreas.**

- 3. Evaluar el estado de las defensas antioxidantes en el hipocampo de las ratas con EAE-CR y el posible efecto de la sal de PEA sobre las mismas en los tres periodos de la enfermedad.**
- 4. Evaluar el sistema GRK/ β -arrestina en el hipocampo de ratas con EAE-CR dado su implicación en la regulación de la señalización desencadenada por mediadores inflamatorios, tanto en procesos inflamatorios agudos como crónicos, y el efecto de la sal de PEA sobre el mismo.**
- 5. Evaluar la integridad del sistema de neurotransmisión somatostatinérgica y el efecto de la sal de PEA sobre el mismo.**

Para abordar dichos objetivos, analizamos los siguientes parámetros:

1. Niveles de distintas poblaciones linfocitarias:
 - 1.1. Determinación, por citometría de flujo, de las poblaciones de células T ($CD4^+$ y $CD8^+$), B, NK y NKT en sangre periférica
 - 1.2. Determinación, por citometría de flujo, de las poblaciones de células T ($CD4^+$ y $CD8^+$), B, NK y NKT en bazo
 - 1.3. Determinación, por inmunohistoquímica, de las poblaciones de células T ($CD4^+$ y $CD8^+$) y microglía
2. Evaluar las poblaciones linfocitarias y la integridad neuronal en áreas implicadas en el control del movimiento y en procesos cognitivos:
 - 2.1. Evaluación de las células T ($CD4^+$ y $CD8^+$), microglía ($Iba-1^+$), inmunoglobulinas, tinción de núcleos apoptóticos y grado de desmielinización en el cerebelo
 - 2.2. Evaluación de las células T ($CD4^+$ y $CD8^+$), microglía ($Iba-1^+$), inmunoglobulinas, tinción de núcleos apoptóticos y grado de desmielinización en los cuerpos mamilares
 - 2.3. Evaluación de las células T ($CD4^+$ y $CD8^+$), microglía ($Iba-1^+$), inmunoglobulinas, astrocitos, tinción de núcleos apoptóticos y grado de desmielinización en el hipocampo

3. Evaluar el estado de las defensas antioxidantes en el hipocampo valorando:
 - 3.1. Los niveles de peroxidación lipídica mediante el análisis de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
 - 3.2. La actividad superóxido dismutasa (SOD) por el método de Minami y Yoshikawa (1979) y niveles proteicos de SOD por inmunoblot
 - 3.3. La actividad catalasa (CAT) por el método de Aebi y col. (1984) y niveles proteicos de CAT por inmunoblot
 - 3.4. La actividad y niveles proteicos de glutatión peroxidasa (GP) y glutatión reductasa (GR) así como los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) según el modelo de Griffith (1980)
 - 3.5. Niveles de colesterol y desmosterol mediante HLPC
4. Evaluar el sistema GRK/ β -arrestina en el hipocampo mediante la determinación de:
 - 4.1. Los niveles proteicos de GRK en membranas por inmunoblot
 - 4.2. Los niveles proteicos de β -arrestina 2 en membrana y citosol por inmunoblot
5. Evaluar la integridad de vía de transducción de señales de la somatostatina (SST), valorando:
 - 5.1. Los niveles tisulares de SST-IR mediante radioinmunoanálisis (RIA)
 - 5.2. La funcionalidad y expresión de los SSTR midiendo:
 - 5.2.1 Los parámetros de equilibrio de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SST-14 a los receptores de SST
 - 5.2.2 La expresión de los subtipos SSTR1-SSTR4 mediante inmunoblot
 - 5.3. La vía de señalización de la adenilato ciclasa (AC) mediante la valoración de:
 - 5.3.1 La actividad AC basal y estimulada por forskolina (FK)
 - 5.3.2 La capacidad de la SST para inhibir la actividad AC
 - 5.3.3 La expresión proteica de las isoformas ACI, ACV/VI y ACVIII mediante inmunoblot
 - 5.3.4 Los niveles proteicos de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las proteínas Gi mediante inmunoblot

Materiales y Métodos

*“Mide lo que se pueda medir; y lo que no, hazlo medible”
[Galileo Galilei]*



1. REACTIVOS

Ácido acético glacial	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido 5-amino 2,3-dihidro-1,4 ftalazinadiona	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido-5,5` - ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido clorhídrico	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido dietilentriaminotetraacético (DPTA)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA)	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetileter)--N,N,N',N'-tetracético (EGTA)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido fórmico	(Fluka Biochemika, St Gallen, Suiza)
Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido p-cumarico	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido sulfúrico	(Panreac Química, Barcelona, España)
Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ácido tricloroacético (TCA)	(Panreac Química, Barcelona, España)
Acrilamida	(Serva, Heidelberg, Alemania)
Adenosín 5'-trifosfato (ATP)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Adenosín 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
[³ H]-Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico ([³ H]-AMPc)	(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
3-Aminopropiltriethoxisilano (TASTE)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Agua oxigenada (H ₂ O ₂)	(Panreac Química, Barcelona, España)
Albúmina sérica bovina (BSA)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Alcohol isoamílico	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Anticuerpo anti-Giα1, anti-Giα2, anti-Giα3	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpos citometría anti-Rat T/B/NK- -Cell Cocktail	(BD Pharmigen, New Jersey, EE.UU.)



Anticuerpos citometría anti-Anti-CD4-	
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	((BD Pharmigen, New Jersey, EE.UU.)
Anticuerpos citometría anti-Anti-CD8-	
Proteína clorofila Peridina (PerCP)	(BD Pharmigen, New Jersey, EE.UU.)
Anticuerpos citometría anti-Anti-CD3-	
Alofocianina (APC)	(BD Pharmigen, New Jersey, EE.UU.)
Anticuerpos citometría anti-Anti-62L-	
Ficoeritrina (PE)	(BD Pharmigen, New Jersey, EE.UU.)
Anticuerpos citometría anti-Anti-RT1B-PerCP	(BD Pharmigen, New Jersey, EE.UU.)
Anticuerpo monoclonal anti-AIF.....	(WAKO, Japón)
Anticuerpo monoclonal anti-CAT, anti-GAPDH.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Anticuerpos monoclonales anti-GRK2,	
anti-GRK5 y anti-GRK6.....	(Santacruz Biotech, California, EE.UU)
Anticuerpos policlonales anti-ACI,	
anti-ACV/VI, anti ACVIII.....	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpos policlonales anti- β -arrestina.....	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpos policlonales anti-SOD	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpos policlonales anti-GR, anti-GP	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpos policlonales anti-SSTR1-4	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Anticuerpos 2arios	
(Ig-G conjugados con peroxidasa).....	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Azida sódica	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Azul de bromofenol.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Bacitracina	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Cacodilato sódico	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Carbón Activo	(Panreac Química, Barcelona, España)
Cloramina T.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)



Cloruro magnésico.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Cloruro de Manganeso (II)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Cloruro sódico	(Fluka Biochemika, St Gallen, Suiza)
Creatina fosfato (CP)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Creatina quinasa (CK)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Dextrano	(Amersham, Buckinghamshire, R.U.)
Diamino-bencidina	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Dietilpirocarbonato (DEPG).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Dihidrógenofosfato sódico	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
2, 6-di-ter-butil-4-metilfenol (BHT)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ditiotreitol	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Dodecil sulfato sódico (SDS)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Etanol.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Fenol	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ficoll	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Formamida desionizada.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Forskolina (FK)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Fosfato potásico	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Fosfato de etanolamina	(Nature-Import, Barcelona, España)
Formaldehído.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Glicina	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Glicerol	(Panreac Química, Barcelona, España)
Guanosín 5'-trifosfato (GTP).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Hematoxilina de Harris.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Hank's Balance Salt Solution (HBSS)	(Lonza, New Jersey, EE.UU.)
Heparina.....	(Roche, Mannheim, Alemania)
n-Hexano	(Panreac Química, Barcelona, España)



Hidrogenofosfato disódico	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Hidróxido potásico	(Panreac Química, Barcelona, España)
Hidróxido sódico	(Panreac Química, Barcelona, España)
Histopaque-1077®.....	(Sigma, ST Louis Mo, España)
Igepal CA-630 (Nonidet P-40)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Inhibidor de tripsina de soja (STI).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Isobutanol	(Panreac Química, Barcelona, España)
Isopropanol	(Fluka Biochemika, St Gallen, Suiza)
Kit de actividad de Glutation Peroxidasa	(BioVision, California, EE.UU)
Kit de actividad de Glutation Reductasa	(BioVision, California, EE.UU)
Kit de ELISA para detección de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).....	(e-Bioscience, California, EE.UU)
Kit de ELISA para detección de interferón- γ (IFN- γ). (e-Bioscience, California, EE.UU)	
Kit de quimioluminiscencia.....	(Santacruz Biotech, California, EE.UU.)
Líquido de centelleo OptiPhase HiSafeII	(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)	(Lonza, New Jersey, EE.UU)
Membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) y Nylon	(Amersham, Buckinghamshire, R.U.)
<i>Micobacterium tuberculosis</i> H37RA.....	(Difco BD, New Jersey, EE.UU.)
β -Mercaptoetanol.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Metabisulfito sódico	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Molibdato amónico tetrahidrato	(Fluka Biochemika, St Gallen, Suiza)
Na ¹²⁵ I.....	(Perkin Elmer, Boston, Ma. EE.UU.)
N, N'-metilen-bisacrilamida.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Ortovanadato de sodio (Na ₃ VO ₄)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Óxido de Aluminio activo (Alúmina).....	(Merck, Darmstadt, Alemania)



Parafina.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Persulfato amónico	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$).....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Polietilenglicol 200 (PEG)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Poliglutiltirosina	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Polivinilpirrolidona.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
1-Propanol	(Panreac Química, Barcelona, España)
Reactivo de Folin-Ciocalceau.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Rojo Ponceau.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Sacarosa	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Sephadex G-25 fino.....	(Amersham, Buckinghamshire, R.U.)
Set de inhibidores de proteasas Complete Mini EDTA-free	
(Roche, Mannheim, Alemania)	
Sistema de amplificación MaxVision®.....	
Somatostatina-14 (SST-14)	(Calbiochem, La Jolla, Ca, EE.UU.)
Estreptavidina-biotina.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Suero de burro	(Invitrogen, Barcelona, España)
Suero fetal bovino (SFB).....	(Invitrogen, Barcelona, España)
Sulfato de cobre (II).....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Sulfato magnésico	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Talco	(Panreac Química, Barcelona, España)
Tampón fosfato salino (PBS)	(Lonza, New Jersey, EE.UU.)
Tartrato sódico potásico.....	(Panreac Química, Barcelona, España)
Teofilina	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Tetrametoxipropano.....	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Trietanolamina (TEA)	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)
Tris-hidroximetil-amino-metano (Tris)	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Tritón X-100.....	(Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)



Tween-20 (Merck, Darmstadt, Alemania)
Tyr¹¹-SST-14 (Bachem, Bubendorf, Suiza)
Xilol (Sigma, St Louis Mo, EE.UU.)

2. ANIMALES Y MODELO DE EXPERIMENTACIÓN

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el presente trabajo, se han utilizado ratas Lewis hembras de 5 a 6 semanas de edad procedentes de Harlan Interfauna Ibérica, S.L. (Barcelona, España). Los animales fueron sometidos a ciclos constantes de luz y oscuridad, manteniéndose el estabulario a una temperatura constante de 22-24° C, con ventilación continua. La alimentación de todos los grupos experimentales constó de pienso granulado (dieta completa de mantenimiento para ratas UAR A04, Panlab). Como bebida, se les suministró agua corriente, *ad libitum*.

Para los diferentes estudios, las ratas se dividieron en los siguientes grupos experimentales: ratas control, ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante (EAE-CR), ratas con EAE-CR pretratadas con la sal de calcio, magnesio y fosfato de etanolamina (PEA) (EAE-CR+PEA) y ratas control pretratadas con la sal de PEA (control+PEA).

2.2. MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL CRÓNICA RECIDIVANTE

2.2.1. Extracción de médula espinal de cobaya

Reactivos

- ✓ Cobayas macho
- ✓ Bisturí
- ✓ Tijeras
- ✓ Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,5
- ✓ Adyuvante completo de Freund (ACF)
- ✓ *Mycobacterium tuberculosis* H37RA

Método

El modelo experimental de EAE-CR se induce con médula espinal de cobaya siguiendo el método de Feurer y col., 1985. La médula espinal se obtiene de cobayas macho de 600-800 g peso sacrificadas con CO₂. Para ello, posterior al sacrificio, se rasura el lomo y se procede a hacer una incisión longitudinal desde la base del cráneo

hasta la cola, con ayuda de un bisturí. Después, se extrae la médula espinal del canal medular abriendo las vértebras con ayuda de unas tijeras.

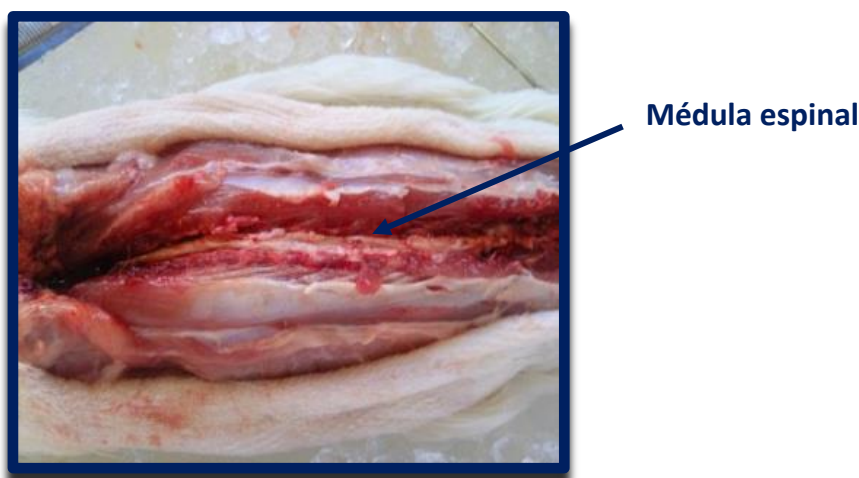


Figura 26: Fotografía del canal medular de un cobaya.

2.2.2. Modelo experimental

El modelo experimental de EAE-CR (Feurer y col., 1985) se llevó a cabo siguiendo la normativa del comité de ética de la Universidad de Alcalá. En dicho modelo, las ratas se inmunizan bajo anestesia en las almohadillas de las patas posteriores con una solución de médula espinal de cobaya (concentración final 290 mg/ml) emulsionada con PBS y ACF suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA), en un volumen final de 100 μ l. A las ratas control y control pretratadas con la sal, se les administra en las patas posteriores el vehículo, una mezcla de PBS y ACF.

Para el seguimiento del progreso de la enfermedad se valoraron diariamente el peso y los signos clínicos usando los siguientes criterios:

- Grado 0: Ningún signo clínico
- Grado 1: Debilidad en la cola
- Grado 2: Debilidad en cola y patas posteriores; dificultad para caminar
- Grado 3: Parálisis de los miembros posteriores
- Grado 4: Parálisis de los miembros posteriores e incontinencia fecal y urinaria

Los animales se sacrificaron en los tres periodos de la enfermedad:

- En el primer brote: intervalo comprendido entre los días 12-15 posterior a la inmunización, cuando las ratas EAE-CR se encuentran en grado 3
- Entre brotes: en torno al día 20 post-inmunización.
- En el segundo brote: en el intervalo comprendido entre los días 28-30, cuando las ratas EAE-CR muestran ataxias cerebelosas.

2.2.3. Tratamiento con la sal de fosfato de etanolamina (PEA)

La sal de PEA se disuelve en agua bidestilada ligeramente acidificada y se administra a los grupos EAE-CR+PEA y control+PEA a una dosis de 600 mg/Kg de peso, en un volumen final de 200 μ l, por vía intraperitoneal. Dicha administración se realiza dos días antes de la inmunización con médula espinal de cobaya o de la administración de PBS/ACF, respectivamente.

3. OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DE BAZO

3.1. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Reactivos

- Tubos BD Vacutainer-Plymouth®
- Histopaque ®-1077
- Tubos Falcon de 50 ml
- Pipetas Pasteur estériles
- Pipetas serológicas de 10 ml
- Tampon Hank's Balance Salt Solution (HBSS) pH 7,4
 - CaCl_2
 - KCl
 - KH_2PO_4
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - NaCl
 - NaHCO_3
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- Glucosa
- Rojo Fenol
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0:
 - NaH_2PO_4 10 mM
 - KH_2PO_4 1,76 mM
 - NaCl 150 mM
 - KCl 2,7 mM
- Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEN) (Lonza)
- Suero fetal bovino (SFB) 5%
- Antibióticos y antimicóticos 1%

Método

Para extraer los linfocitos de sangre periférica, se realiza una punción cardiaca a ratas anestesiadas con isofluorano. La sangre extraída se introduce en tubos BD Vacutainer-Plymouth ® y se mantienen en frío hasta el momento del aislamiento de linfocitos.

La sangre extraída y mantenida en frío se centrifuga durante 20 minutos a 2000 rpm con una rampa de aceleración 9 y frenado 8. Se forman tres fases que corresponden a: fase “A”= plasma, fase “B”= células mononucleadas y fase “C”= eritrocitos (**Figura 27**). Se recoge la fase A, se alícuota en tubos para su posterior análisis y se deja una alícuota para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

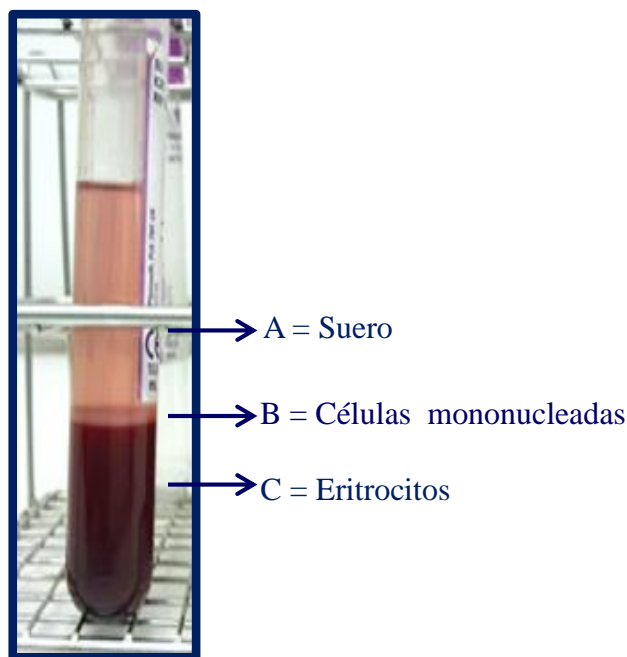


Figura 27: Fases de sangre tras la primera centrifugación. Se distingue: fase “A”= suero, fase “B”= células mononucleadas y fase “C” = eritrocitos.

Se recoge la fase B y se resuspende en 10 ml de medio HBSS en un tubo Falcon de 50 ml. A dicha suspensión se le añaden 10 ml de Histopaque®-1077 desde la base del tubo, es importante que la sangre no se mezcle con el Histopaque®-1077 por lo que se ha de añadir muy despacio. Posteriormente, se centrifuga el tubo a 1300 rpm durante 25 minutos a 20°C con una rampa de aceleración 3 y frenado 1. Tras la centrifugación, se pueden observar las diferentes fases formadas: fase “B₁” correspondiente a plasma, fase “B₂” que corresponde al Histopaque®-1077, fase “B₃” que contiene las células mononucleares y fase “B₄” que contiene eritrocitos (**Figura 28**). Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se recoge la fase que corresponde a las células mononucleares, fase “B₂” (**Figura 28**). Las células aisladas se transfieren a un tubo cónico y se añaden 10 ml de PBS, mezclando suavemente. Posteriormente, se centrifuga el tubo a 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C, se aspira y desecha el sobrenadante, lo que permite obtener las células mononucleares, entre las que se encuentran los linfocitos de sangre periférica. El sedimento se resuspende en un volumen de 5 ml de medio DMEN, y se procede al recuento de las células con la ayuda de una cámara de Neubauer. Posteriormente, se procede a ajustar las suspensiones celulares a 2×10^6 células/ml para

realizar el estudio inmunofenotípico de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

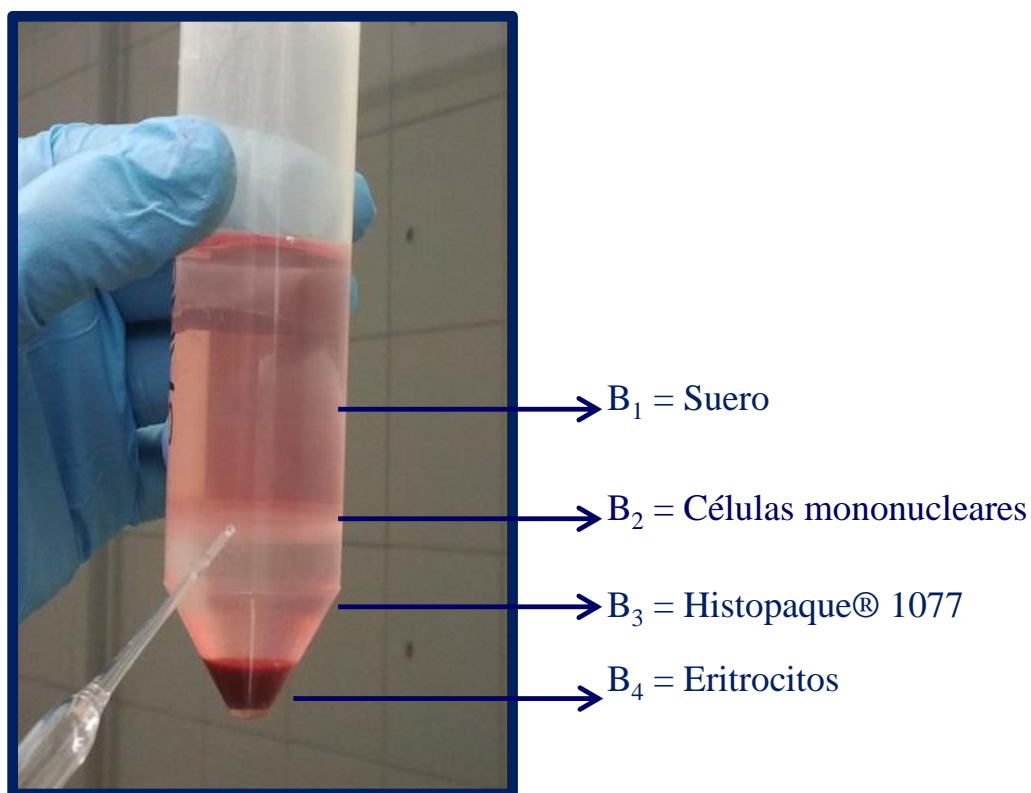


Figura 28: Fases obtenidas tras la centrifugación en gradiente de densidad de la fracción B de sangre periférica. Se pueden observar la fase B₁, que corresponde al suero, la fase B₂ que corresponde a las células mononucleares, B₃ que corresponde a Histopaque® 1077 y B₄ que corresponde a eritrocitos.

3.2 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE BAZO

Reactivos

- Bisturí
- Tijeras
- Pinzas
- Homogeneizador Potter
- Tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) pH 7,4:
 - CaCl₂
 - KCl
 - KH₂PO₄
 - MgSO₄ • 7H₂O

- NaCl
- NaHCO₃
- NaH₂PO₄ • 7H₂O
- Glucosa
- Rojo Fenol
- Filtro de 70µm (BD Biociencias, REF 352350)
- Tampón fosfato salino (PBS), pH 7,0:
 - NaH₂PO₄ 10 mM
 - KH₂PO₄ 1,76 mM
 - NaCl 150 mM
 - KCl 2,7 mM
- Medio DMEN (Lonza)
- Suero fetal bovino (SBF) 5%
- Antibióticos y antimicóticos 1%
- Histopaque®-1077

Método

Una vez sacrificadas las ratas, se procede a la extracción del bazo, localizado en la parte derecha del abdomen del animal. Previamente, se corta el pelo del animal con ayuda de una maquinilla y se limpia la zona con Betadine®. Después, con ayuda de un bisturí se realiza una incisión a lo largo de la línea alba para retirar la piel y los músculos abdominales y se extrae el bazo.

El aislamiento de los linfocitos de bazo se realiza por un método modificado de (Basista y col., 1991). El bazo recién extirpado se trocea y se introduce en medio DMEN suplementado con SFB al 5%. A continuación, en una campana de flujo laminar, se procede a homogeneizar el tejido con la ayuda de un homogeneizador potter. Posteriormente, se filtra el homogenado con un filtro de 70 µm y se transfiere a un tubo Falcon de 50 ml, donde se realiza una centrifugación en gradiente de densidad con Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) (densidad = 1,083±0,001 g/ml). Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, se extrae la fracción en la que se encuentra las células mononucleadas. A continuación, se centrifuga el extracto a 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retira el sobrenadante y se resuspende el sedimento en tampón HBSS.

Se realiza otra centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en un volumen de 5 ml de medio DMEN suplementado con SFB al 5%, procediendo al recuento de las células con la ayuda de una cámara de Neubauer. Posteriormente, se procede a ajustar las suspensiones celulares a 2×10^6 células/ml para realizar el estudio inmunofenotípico de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo. Una fracción de las células aisladas se pasa a una placa Petrie con medio DMEN suplementado con 5% SFB y 1% antibiótico/antimicóticos y se mantiene en el incubador.

4. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y BAZO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el estudio inmunofenotípico de las poblaciones linfocitarias, se recurrió a la técnica de citometría de flujo. Esta es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (en este caso células) alineadas y de una en una por un haz de laser focalizado. Con esta técnica, se pueden medir múltiples características físicas de una sola célula. Los parámetros analizados son los que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 7: Criterios de definición para las poblaciones del sistema inmune examinadas.

Subpoblación de células del sistema inmune	Función asociada con los receptores de superficie indicados
CD3	Módulo de transducción de señal de células T para antígenos (complejo TCR/CD3). Expresado por todos los subgrupos de células T.
CD4	Co-receptor del complejo TCR/CD3 que reconoce antígenos presentados por moléculas de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Identifica células Th.
CD8	Co-receptor del complejo TCR/CD3 que reconoce antígenos presentados por MHC de clase I. Identifica células Tc.
CD45RA	Isoforma de alto peso molecular del CD45 presente en los linfocitos B de rata (Woollett y col., 1985).
CD161a	Conocido también como NKR-P1, se trata de un receptor transmembrana de tipo II que se expresa principalmente en las células NK y un subgrupo de células T denominadas NKT.

Reactivos

- Rat T/B/NK Cell Cocktail (BD Pharmigen, REF: 558495). Consta de anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD45RA y anticuerpo anti-CD161a
- Anti-CD4-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmigen, REF: 554837)
- Anti-CD8-Proteína clorofila Peridinina (PerCP) (BD Pharmigen, REF:558824)
- Anti-CD3-Aloficocianina (APC) (BD Pharmigen, REF: 557030)

- Suero fetal bovino (SFB) 1,0%
- Tubos para citometría de flujo
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0:
 - NaH_2PO_4 10 mM
 - KH_2PO_4 1,76 mM
 - NaCl 150 mM
 - KCl 2,7 mM

Método

Para el estudio inmunofenotípico de las diferentes poblaciones de linfocitos T, B y NK, de sangre periférica y bazo, y su grado de activación, se utiliza un cocktail de anticuerpos específicos de la casa comercial BD Pharmigen (Rat T/B/NK Cell Cocktail), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y anticuerpos anti CD4, CD3 y CD8. En breve, una vez determinada la densidad de células con ayuda de la cámara de Neubauer, se toma un volumen adecuado para tener una concentración de 200.000 células/ml y se transfiere a tubos Eppendorf estériles. Se añade 10 μl de los anticuerpos correspondientes a cada tubo en función tanto del fenotipo que queremos mirar como de la combinación de los fluorocromos de excitación a los que están asociados los anticuerpos (**Tabla 8**).

Las muestras se incuban 20 minutos a 4°C. A continuación, se lavan con solución HBSS suplementado con 10% de SFB y se centrifugan durante 5 minutos a 1350 rpm. Posteriormente, se añaden 400 μl de PBS y se procede a determinar las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo en FACSCalibur (Beckton Dickinson).

Tabla 8: Combinación de anticuerpos para el estudio inmunofenotípico

Laser	Fluorescencia FL1 (FITC)	Fluorescencia FL2 (PE)	Fluorescencia FL3 (PerCP)	Fluorescencia FL4 (APC)
Tubo1	CD4	CD161a	CD8	CD3
Tubo2	CD4		CD8	CD3
Tubo3	CD45RA	CD161a	CD8	CD3
Tubo4	CD45RA		CD8	CD3

5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS TNF- α E IFN- γ

La determinación de los niveles de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ se realiza con un Kit de ELISAS-sándwich comercial de eBioscience. El estudio se realiza en suero y fracción citoplasmática de hipocampo de rata.

5.1. OBTENCIÓN DE SUERO

La sangre extraída por punción cardíaca se deposita en tubos Falcon de 15 ml y se deja reposar 25 minutos a temperatura ambiente para que se produzca la coagulación de la sangre. Posteriormente, se centrifuga la muestra a 1300 rpm durante 15 minutos a 18°C. El sobrenadante resultante se alícuota y se deja una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

5.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS

El principio de la técnica es adsorber el anticuerpo que van a reconocer la citoquina, que se quiere detectar, en la base de los pocillos de una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añaden a la placa concentraciones conocidas de la citoquina, para obtener la curva de calibrado, y las muestras previamente diluidas, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos adsorbidos en la base de la placa reconocen las citoquinas proinflamatorias, tanto de la curva de calibrado como de las muestras, y se une a ellas por enlace covalente. A continuación se realizan lavados para

retirar los que no se ha unido. Para detectar las citoquinas unidas a los anticuerpos adsorbido en la placa, se añade una solución de biotina-conjugada con otro anticuerpo de la citoquina que se quiere detectar. Tras la incubación, se realizan varios lavados y se añade una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, esta reconocerá a la biotina conjugada con el anticuerpo. Por último se agregara una solución sustrato que reaccionará con la peroxidasa de rábano dando una coloración. El color obtenido estará en función de la concentración de citoquina proinflamatoria que haya en cada pocillo. La reacción se detiene con una solución de terminación y posteriormente se lee en un espectrofotómetro a 450 nm. Los niveles de citoquinas se determinaran interpolando la absorbancia obtenida en la curva de calibrado y los resultados se expresan por mg de proteína.

6. DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO

6.1. EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO

Las ratas se anestesian con isoflurano (IsoFlo®) en un nebulizador de anestesia con un 2% de aporte de isoflurano. A continuación, se sacrifican mediante punción cardiaca para la extracción de sangre como se explica en el **apartado 3**. Posteriormente, se decapitan con guillotina a nivel de la primera y segunda vértebra cervical e inmediatamente después, se procede a la extracción del encéfalo. Para ello, se coloca la cabeza encima de una superficie metálica fría, se realiza una incisión longitudinal desde el hocico hasta la nuca, se retira la piel y se disecan los músculos dorsales de la nuca. El siguiente paso consiste en introducir la punta de una tijera fina en los márgenes del agujero occipital, de manera laterodorsal al bulbo raquídeo, en dirección oblicua hacia el conducto auditivo. Con unas pinzas, se separa el hueso occipital, haciendo presión hacia fuera y, del mismo modo, se levantan los huesos parietales, haciendo tracción hacia arriba. Al separar los huesos parietales, normalmente se desprende la duramadre, dejando accesible el cerebro. Si esto no ocurre, se corta longitudinalmente en dirección al espacio interhemisférico y se separa posteriormente hacia los lados con unas pinzas finas. Para poder obtener el encéfalo en su totalidad, a veces es necesario ampliar la craneotomía mediante sección y eliminación de los huesos frontales.

Una vez aislada la porción dorsal del cerebro, con una espátula roma, se seccionan los nervios olfatorios pasando la espátula por debajo y por delante de la sutura frontoparietal. Posteriormente, se seccionan los fascículos ópticos, las arterias

carótidas, el tallo hipofisiario y los nervios craneales que salen a uno y otro lado del tronco cerebral, quedando libre el encéfalo, que se extrae y se deposita sobre la placa de metal enfriada en hielo.

6.2 DISECCIÓN DEL HIPOCAMPO

Una vez extraído el encéfalo, la extracción del hipocampo se realiza por el método de Glowinski e Iversen (1966). El cerebro se deja reposar sobre su parte convexa y se separa el rombencéfalo (A) del resto del cerebro mediante una sección transversal (**Figura 29**), descartándolo. A continuación, se realiza una sección transversal a nivel del quiasma óptico que pasa a través de la comisura anterior (**Figura 29**), el cual delimita la parte anterior del hipotálamo. Esta sección separa el cerebro en dos partes: B y C.

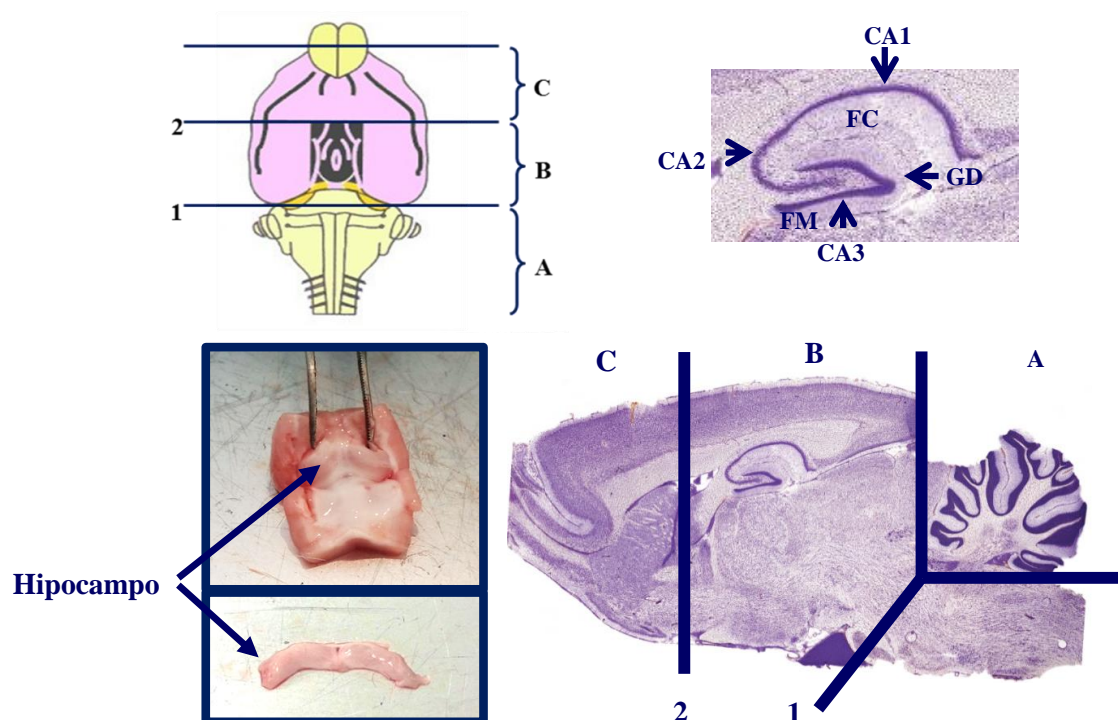


Figura 29: Representación esquemática de la disección del cerebro, localización del hipocampo y fotografías del hipocampo diseccionado. Se representan algunas áreas cerebrales: CA; cuerno de Amón, en la que a su vez se han representado tres de sus áreas: CA1, CA2 y CA3; GD: giro dentado; FM: fibras musgosas; FC: fibras colaterales de Schaffer. El hipocampo se obtiene de la parte B, eliminando el cerebelo medio y dejando así dicha estructura al descubierto.

7. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS CELULARES, FRACCIÓN CITOPLASMÁTICA Y FRACCIÓN SOLUBLE DE HIPOCAMPO

7.1. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS Y FRACCIÓN CITOPLASMÁTICA

Reactivos

- Tampón HEPES 10 mM, pH 7,6
- Tampón de homogeneización:
 - HEPES 10 mM, pH 7,6
 - EDTA 5 mM
 - EGTA 1 mM
 - Na₃VO₄ 1mM
 - Una pastilla de Complete mini, EDTA-free de Roche por cada 50 ml de tampón (cocktail de inhibidores de proteasa)
- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5

Método

El método de aislamiento de membranas se lleva a cabo según el modelo descrito por Reubi (1981). El hipocampo se suspende en 2 ml de tampón de homogeneización frío y se homogeneiza 1 minuto con el Polytron a velocidad moderada (posición 5). A continuación, se centrifugan las muestras a 600 x g durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante (sobrenadante “A”), descartando el precipitado. Este sobrenadante A se centrifuga a 48000 x g durante 30 minutos a 4°C, recogiendo de nuevo el sobrenadante (sobrenadante “B”) en tubos de policarbonato. El precipitado (precipitado “A”) se resuspende en 10 ml de HEPES 10 mM, se centrifuga nuevamente a 48000 x g durante 30 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante. El precipitado “A” se resuspende en 500 µl de Tris- HCl 50 mM y se alícuota. Estas alícuotas se conservan a 80 °C, guardando una pequeña muestra de 25 µl para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951), que se detallará más adelante. El sobrenadante “B” corresponde a la fracción citoplasmática, se le añade inhibidores de proteasa, y posteriormente se alícuota y se conserva a -80°C. Se separa una pequeña alícuota de 25 µl para medir la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

7.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE HIPOCAMPO

Reactivos

- Tampón de lisis:
 - HEPES 20 mM, pH 7,5
 - EDTA 1 mM
 - NaCl 150 mM
 - Triton X-100 1%
 - Glicerol 5%
 - Inhibidor de tripsina de soja (STI) 5 µg/ml
 - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM
 - Aprotinina 5 µg/ml
 - Leupeptina 5 µg/ml
 - Na₃VO₄ 1 mM
 - Pirofosfato sódico (Na₄P₂O₇)

Método

La obtención de la fracción soluble se basa en el protocolo de Hawes (Hawes y Picciotto, 2004). Tras aislar el hipocampo, se extrae una pequeña fracción de éste y se suspende en 500 µl de tampón de lisis. A continuación, se sónica la muestra 15 segundos y se incuba 30 minutos a 4°C en agitación. Pasado este tiempo, se centrifuga la muestra a 16000 x g, 15 minutos y se alícuota el sobrenadante. Para determinar la concentración de proteínas, se extrae una pequeña alícuota de 25 µl y se utiliza el método de Lowry (1951).

8. MARCAJE DE TYR¹¹-SOMATOSTATINA-14 CON Na ¹²⁵I

El marcaje de la Tyr¹¹-SST-14 se realiza según el método descrito por Greenwood (Greenwood y col., 1997). Después de la reacción del marcaje, se purifica la mezcla de reacción por cromatografía de exclusión molecular para separar el trazador del ¹²⁵I no unido y del resto de las impurezas que le acompañan. La purificación se realiza en una columna de Sephadex G-25 fino equilibrada con ácido acético 0,1 M/BSA 0,1%.



Reactivos

- Tyr¹¹-Somatostatina-14:
 - Se disuelven 0,5 mg de Tyr¹¹-SST-14 en 0,5 ml de ácido acético 0,1 M. A 100 µl de la solución del péptido, se le añaden 300 µl de un tampón acetato sódico 0,1M a pH 7,4. Se utilizan 10 µl de dicha solución para el marcaje.
- Cloramina T (C₇H₇SO₂NaCl • 3H₂O):
 - Se disuelven 10 mg de cloramina T en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. Se prepara dicha solución 10 minutos antes del marcaje y se deja en oscuridad hasta su uso.
- Metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅):
 - Se disuelven 20 mg de metabisulfito sódico en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5.
- Tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,4 con 0,25% de BSA:
 - Se disuelven 1,15 g de Na₂HPO₄ y 0,296 g de NaH₂PO₄ en 100 ml de agua bidestilada y se ajusta el pH. Después, se separan 50 ml y se añaden 0,125 g de BSA.
- Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 con 5% talco:
 - Se toman los 50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M que sobran de preparar el tampón anterior y se le añaden 2,5 g de talco. Se mantiene en agitación continua.
- Tampón de elución:
 - Ácido acético 0,1 M con 0,1% de BSA.

8.1. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA

Se añaden 10 g de Sephadex G-25 (fino) a 50 ml de agua destilada y desionizada, hirviendo la mezcla al baño maría durante 1 hora. Después, se deja reposar la mezcla para eliminar, posteriormente, el agua. A este Sephadex, se le añaden 50 ml de tampón de elución y se deposita la mezcla en una columna de vidrio de 1 x 45 cm hasta conseguir una altura aproximada de 40 cm. Una vez empaquetada, se equilibra con 50 ml de tampón de elución frío.

8.2. MARCAJE

La reacción de marcaje tiene lugar a temperatura ambiente, dentro de una campana de flujo laminar protegido con filtros HEPA y cristal plomado, en un tubo eppendorf que contiene 10 μ l de Tyr¹¹-SST-14 (2,5 μ g). A este tubo se le añaden 40 μ l de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5 y, a continuación, se retiran 10 μ l para que la cantidad de Tyr¹¹-SST-14 que quede para el marcaje sea de 2 μ g. Posteriormente, se añade 1mCi de Na ¹²⁵I y 5 μ l de la disolución de Cloramina T (empleado como oxidante débil) y se agita la mezcla durante 30 segundos. Inmediatamente después, se agregan 5 μ l de la disolución de metabisulfito sódico y 200 μ l de tampón de elución para detener la reacción. Se toma 1 μ l de la mezcla de marcaje (Na ¹²⁵I) y se pasa a un tubo que contiene 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 con BSA 0,25% para determinar el porcentaje de incorporación de ¹²⁵I al péptido mediante el test de adsorción al talco.

8.3. PURIFICACIÓN

Se deja que el volumen de líquido que se encuentra por encima del Sephadex G-25 penetre en el lecho cromatográfico y se añade la mezcla de reacción, esperando a que penetre en el gel. Se va añadiendo tampón de elución a razón de 30 ml/h y con un colector de fracciones, se van recogiendo alícuotas de 1 ml. Se toman 10 μ l de cada fracción para contar la radiactividad y realizar un perfil del marcaje (**Figura 30**). Las fracciones que corresponden al péptido marcado se mezclan y se reparte el volumen resultante en alícuotas de 0,2 ml que se conservan a -20 °C.

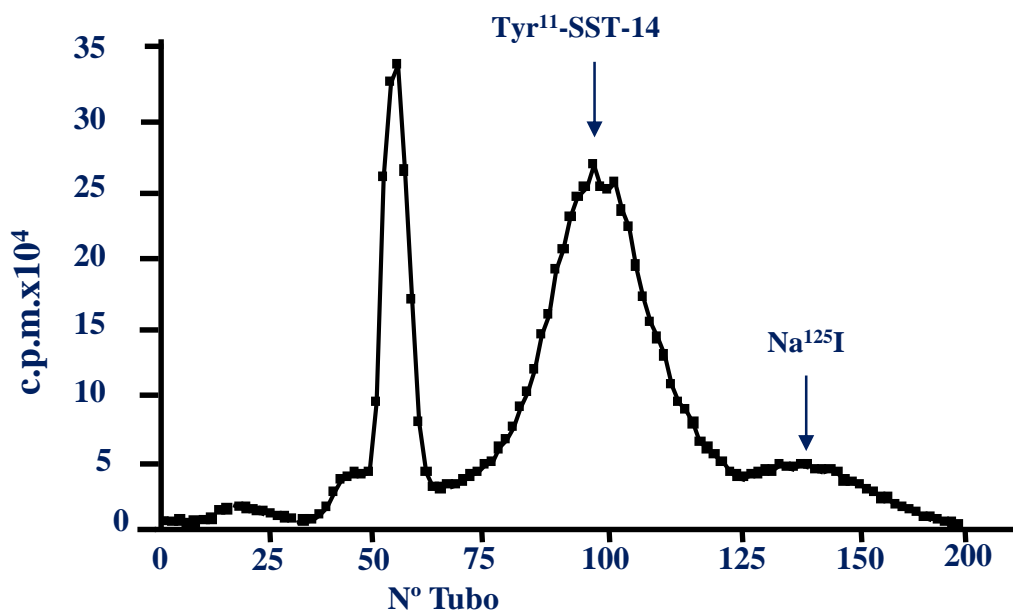


Figura 30: Purificación de la Tyr¹¹-SST-14 marcada con ¹²⁵I en una columna de Sephadex G-25.

8.4. TEST DE ADSORCIÓN A TALCO

A 1 µl de la mezcla de reacción, cuya radiactividad se ha medido previamente, se le añade 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4, que contiene BSA al 0,25 % y 1 ml de suspensión de talco 5 % en tampón fosfato sódico 0,1M pH 7,4. Se centrifuga la mezcla a 750 x g durante 10 minutos, se aspira el sobrenadante y se mide la radiación emitida por el pellet que queda tras la centrifugación. Conociendo la radiactividad total en cuentas por minuto (c.p.m total) de la muestra antes del test y la radiactividad del pellet (c.p.m pellet), el porcentaje de incorporación (% I) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%I = \frac{\text{cpm sedimento}}{\text{cpm total}} \times 100$$

9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SOMATOSTATINA TISULAR

9.1. EXTRACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR

La extracción de la SST tisular se realiza mediante el método modificado de Patel y Reichlin (1978). Una vez aislado el hipocampo, se deposita una pequeña muestra de tejido en tubos de vidrio que contienen 1 ml de ácido acético 2 N. Las muestras se homogeneizan con el *Polytron* a velocidad moderada (posición 5) y se hierven a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras se dejan reposar 5 minutos en hielo y posteriormente se vuelven a homogeneizar con el *Polytron* durante 30 segundos. El homogenado se centrifuga a 15000 x g durante 5 minutos, a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se alícuota, guardando las muestras a -20 °C hasta el día del ensayo. Se utiliza una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

9.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SOMATOSTATINA TISULAR

Reactivos

- Tampón RIA:
 - Tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,2
 - Ácida sódica 0,1%
 - BSA 0,2%
- $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SST diluida en tampón RIA (aprox. 60 c.p.m./ μl)
- SST "fría" para la curva

Método

La concentración de SST en los extractos de hipocampo se determina por radioinmunoanálisis (RIA) siguiendo el método modificado de Patel y Reichlin (1978). La determinación de los niveles de SST inmunoreactiva se realiza en tubos de vidrio que contienen:

- 100 μl de extracto tisular ó 100 μl de SST a una concentración de 0 a 1000 fmol/tubo (curva de calibrado), diluido en tampón RIA
- 400 μl de tampón RIA
- 100 μl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SST diluida en tampón RIA (aproximadamente a 6000 c.p.m./tubo)

- 200 µl de anticuerpo anti-SST en tampón RIA

Por otro lado, se preparan cuatro tubos de actividad total que solo contiene 100 µl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST}$, dos tubos con 700 µl de tampón de RIA y 100 µl de péptido marcado para calcular la unión inespecífica y dos tubos con 600 µl de tampón RIA, 100 µl de un pool del extracto tisular y 100 µl de péptido marcado, para calcular el inespecífico de las muestras. Todos los tubos se incuban durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se añade a todos los tubos, excepto a los de actividad total, 1 ml de carbón activo (2 %) / dextrano (0,2 %). Se dejan reposar los tubos en hielo durante 15 minutos y después se centrifugan a 2000 x g durante 10 minutos para separar la fracción de SST unida de la fracción no unida al anticuerpo. Finalmente, se aspira el sobrenadante y se mide la radiactividad en el sedimento con un contador de centelleo sólido (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS).

10. UNIÓN DE LA SOMATOSTATINA A SUS RECEPTORES ESPECÍFICOS EN MEMBRANAS DE HIPOCAMPO

La unión específica de la SST se determina mediante un método modificado de Czernik y Petrack (1983).

Reactivos

- Ácido acético 0,1 M con BSA 0,1%
- Tampón de incubación
 - Tris-HCl 50 mM, pH 7,5
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM
 - BSA 0,2 %
 - Bacitracina 0,1 mg/ml
- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4/ Sacarosa 9%
- Somatostatina fría:
 - A partir de una alícuota de SST-14 ($6,1 \times 10^{-4}$ M) disuelta en ácido acético 0,1 M que contiene BSA 0,1 %, se prepara una curva de SST en tampón de incubación a concentraciones finales de 10^{-11} a 10^{-7} M. Esta última concentración se utiliza para estudiar la unión inespecífica.
- $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST}$:

- Una alícuota de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST}$ se diluye en tampón de incubación hasta una concentración final de 250 pM.
- **Membranas hipocampales:**
 - Las membranas obtenidas según el método descrito anteriormente (**sección 7.1**) se resuspenden en tampón de incubación a una concentración final de 0,15 mg/ml.

Método

Para la realización del experimento, las membranas se incuban con los reactivos en tubos de tipo Beckman en un volumen final de 250 μl .

Los reactivos se añaden en el siguiente orden y volumen:

- 175 μl de tampón de incubación
- 25 μl de SST “fría” (10^{-11} - 10^{-7}M). Los tubos con concentración “cero” llevan 25 μl de tampón de incubación
- 25 μl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST}$ (250 pM) en tampón de incubación.
- 25 μl de membranas (momento en el que comienza la reacción)

Los tubos se incuban 60 minutos en un baño a 30 °C sin agitación. Al cabo de este periodo, las muestras se centrifugan en una microfuga a 11000 x g durante 2 minutos. A continuación, se aspira el sobrenadante y se lava el precipitado con Tris/sacarosa, determinándose las c.p.m. en un contador de centelleo sólido (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS) con una eficacia de conteo para el ^{125}I del 86 %.

Para calcular la radiactividad que se une de manera inespecífica ($B_{\text{inespecífica}}$) y poder restarla de la unión total (B_{total}) de cada muestra, se preparan dos tubos que contienen una cantidad de SST-14 “fría” (10^{-7}M). Por otro lado, se preparan tubos que contienen únicamente 25 μl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST}$ (actividad total). Los resultados se expresan en porcentaje de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST}$ unido específicamente (% B) respecto a la actividad total:

$$\%B = \frac{(B_{\text{total}} - B_{\text{inespecífica}}) \times 100}{\text{Actividad total}}$$



Finalmente, los datos se representan y analizan conforme el método de Scatchard (1949).

11. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Reactivos

- TTBS pH 7,5:
 - Tris-HCl 50 mM
 - NaCl 50 mM
 - Tween-20 0,5 %
- Acrilamida/Bisacrilamida 30 % (29,2% / 0,8% respectivamente)
- Tampón de muestras pH 6,8:
 - Tris-HCl 60 mM, pH 6,8
 - SDS 3 %
 - Glicerol 10 %
 - β -mercaptoetanol 1%
 - Azul de bromofenol 0,003 %
- Tampón de electroforesis pH 8,5:
 - Tris-HCl 50 mM
 - Glicina 384 mM
 - SDS 0,1 %
- Tampón de transferencia pH 8,3:
 - Tris-HCl 125 mM
 - Glicina 192 mM
 - Metanol 20 %
 - SDS 0,05 %
- Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
- Tris HCl 0,5 M pH 6,8

Método

11.1. PREPARACIÓN DE LOS GELES

Para la inmunodetección de proteínas es necesario efectuar una separación previa de las proteínas en función de su peso molecular en geles de SDS desnaturalizantes. Los geles constan de dos partes: separador y concentrador. El tamaño

de poro del gel separador estará en función del tamaño de proteína que queramos separar. Así, se emplean geles del 12 % para proteínas de bajo o medio peso molecular y geles del 8 % para proteínas de gran peso molecular.

- Gel separador (12 % u 8 %):
 - Tris- HCl 1,5 mM, pH 8,8
 - SDS 10 %
 - Acrilamida/bisacrilamida 30 %
 - Persulfato amónico 0,1 mg/ml
 - TEMED
 - Agua
- Gel concentrador (5 %):
 - Tris- HCl 0,5 mM, pH 6,8
 - SDS 10 %
 - Acrilamida/bisacrilamida 30 %
 - Persulfato amónico 0,1 % mg/ml
 - TEMED
 - Agua

11.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se toma un volumen de muestra que contenga una cantidad de 100 µg de proteína y se centrifuga a 11000 x g durante 5 minutos en una minifuga. A continuación, se aspira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en tampón de muestras a una concentración final de 5 µg/ µl. En el caso de muestras de citoplasma o fracción soluble celular, estas se diluyen directamente en el tampón de muestras hasta dejarlas a la concentración deseada. Una vez diluidas y antes de cargarlas en el gel, se calienta la muestra a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y se cargan 100 µg de proteínas en cada pocillo del gel. Se reserva uno de los pocillos para marcadores de peso molecular.

11.3. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA

La electroforesis se realiza a 100 V a temperatura ambiente en tampón de electroforesis. A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF

activada previamente con metanol. Para ello introducimos los geles y las membranas de PVDF en una cubeta de transferencia con tampón de transferencia y se le aplica un campo eléctrico de 400 mA durante 90 minutos a 4°C o a 15 V durante toda la noche.

11.4. INMUNODETECCIÓN

Las membranas de PVDF se extraen del cassette de transferencia y se depositan en cajas en donde se incubarán con los anticuerpos. Para ello se preparan los anticuerpos primarios y secundarios a una concentración adecuada en TTBS suplementada con 1 % de Tween-20. Las membranas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (**Tabla 9**). Posteriormente se realizan 3 lavados con TTBS para extraer el exceso de anticuerpo primario. A continuación, las membranas se incuban durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano correspondiente diluido 1/5000. Finalmente se retira el anticuerpo secundario y se realiza un mínimo de seis lavados de 5 minutos cada uno con TTBS para eliminar por completo los restos de anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando ECL y placas fotográficas *Hyperfilm* AGFA. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las películas fotográficas se realiza con el programa Scion Image (Scion Corp., Maryland, EE.UU.).

Tabla 9: Relación anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario
Anti-ACI, V/VI (policlonal)	1/1000	Anti-conejo
Anti-ACVIII (policlonal)	1/1000	Anti-cabra
Anti-Calceneurina	1/1000	Anti-ratón
Anti-Catalasa (monoclonal)	1/1000	Anti-ratón
Anti-GAPDH (monoclonal)	1/1000	Anti-cabra
Anti-Gi α 1-2 (monoclonal)	1/1000	Anti-ratón
Anti-Gi α 3 (policlonal)	1/1000	Anti-conejo
Anti-Glutation peroxidasa (policlonal)	1/1000	Anti-ratón
Anti-Glutation reductasa (policlonal)	1/1000	Anti-ratón
Anti-GRK2 (monoclonal)	1/1000	Anti-ratón
Anti-GRK5-6 (policlonal)	1/1000	Anti-conejo
Anti-SOD (policlonal)	1/1000	Anti- cabra
Anti-SSTR1-4 (policlonal)	1/1000	Anti-cabra
Anti- β -arrestina (policlonal)	1/1000	Anti- ratón
Anti- β -Tubulina (monoclonal)	1/5000	Anti-ratón

12. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA

El estudio de la actividad adenilato ciclasa (AC) se ha llevado a cabo de acuerdo con el método de Houslay (1976), con pequeñas modificaciones. Este método se basa en cuantificar el AMPc producido mediante el método de la proteína enlazante, estableciendo una competición entre el AMPc producido, cuya concentración se desea averiguar, y el ^3H -AMPc que se añade al medio a una concentración determinada, compitiendo ambos por unirse a la subunidades reguladoras de la proteína quinasa A (PKA).

Reactivos

- Trietanolamina (TEA) 25 mM pH 7,4
- TEA 25 mM, pH 7,4/BSA 0,1 %



- Tampón 1:
 - EDTA 6 mM y MgSO₄ 30 mM en TEA 25 mM, pH 7,4
- Tampón 2:
 - IBMX 6 mM, bacitracina 6 mg/ml y PMSF 0,6 mM en TEA 25 mM, pH 7,4
- Creatina fosfato (CP) 90 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4
- Creatina quinasa (CK) 12 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4
- Guanosin 5'-trifosfato (GTP) 10 µM en TEA 25 mM, pH 7,4
- Adenosin 5'-trifosfato (ATP) 15 mM en TEA 25 mM, pH 7,4
- Coctel:
 - 1 volumen de tampón 1
 - 1 volumen de tampón 2
 - 0,5 volúmenes de CP
 - 0,5 volúmenes de CK
 - 0,006 volúmenes de GTP
- Medio de la curva
 - 1 volumen de tampón 1
 - 1 volumen de tampón 2
 - 1,6 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4
 - 0,4 volúmenes de ATP
- Medio de dilución
 - 1 volumen de tampón 1
 - 1 volumen de tampón 2
 - 2 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4
- Alúmina
 - 0,75 mg/ml de alúmina en TEA 25 mM, pH 7,4. Se mantiene en agitación continua.
- Solución PK
 - 100 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5
 - 2 g de BSA
 - 0,186 g de EDTA
 - 0,0144 g de teofilina
 - 41 µl de β-mercaptoetanol

- Adenosin monofosfato cíclico (AMPc): 1 mmol/ml en tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5
- Somatostatina-14 (SST-14)
 - Se utiliza la SST-14 como inhibidor de la actividad AC a una concentración final de 10^{-4} M, diluida en TEA 25 mM pH 7,4, que contiene 0,1 % de BSA.
- Forskolina:
 - Partiendo de una alícuota de forskolina (FK) 10^{-2} M disuelta en DMSO, se hace una dilución con TEA 25 mM pH 7,4 hasta una concentración final de 10^{-5} M.
- ^3H -AMPc:
 - Se diluye una preparación comercial de ^3H -AMPc (sal amónica en solución de etanol 50:50) en tampón fosfato 0,05 M pH 6,5 para obtener una concentración final de 0,1 M. Se diluye esta solución de ^3H -AMPc 1/16 en tampón fosfato 0,05 M, pH 6,5.

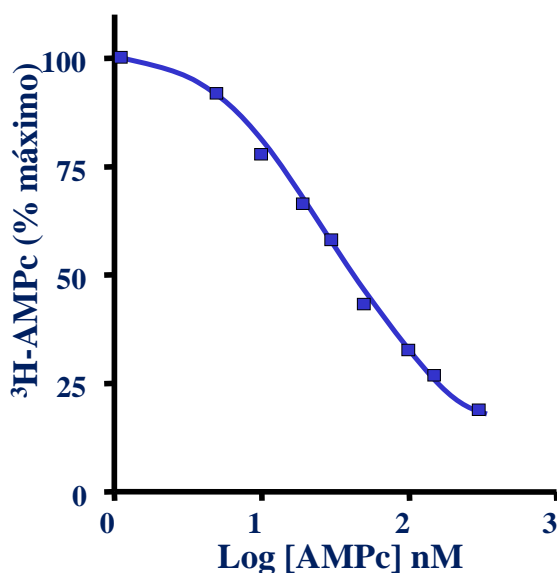


Figura 31: Curva estándar para la valoración de la producción de AMPc, por el método de la proteína enlazante.

➤ Obtención de la proteína quinasa A:

La obtención de la proteína quinasa A se realiza siguiendo el protocolo de Gilman (1970). La PKA se extrae de músculos de conejo. Los músculos de las extremidades y del dorso del conejo se trocean con ayuda de unas tijeras y se homogeneizan en 2,5 volúmenes de EDTA 4 mM, pH 7 en un homogeneizador de aspas (*Ommi-Mixer* de Dupont Instruments) a velocidad máxima, durante 2 minutos, en frío. El homogeneizado se filtra con una gasa y se centrifuga a 8000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar a 10000 xg durante 30 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se ajusta el pH a 6,1 con ácido acético 1 N. La solución se deja reposar 1 hora en frío con el fin de precipitar las proteínas (fosforilasa quinasa y glucógeno sintetasa). Posteriormente, se centrifuga la mezcla a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C, se recoge el sobrenadante y se ajusta su pH a 5,5 con ácido acético 1 N y se deja reposar en hielo 1 hora. Pasado ese tiempo, se vuelve a centrifugar a 10000 x g durante 30 minutos y a 4°C, se recoge el sobrenadante y se ajusta su pH a 6,8 con tampón fosfato potásico 1 M, pH 7,2. A continuación, se añade poco a poco $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido (32 gramos /100 ml de sobrenadante) para precipitar proteínas. Se mantiene la mezcla en agitación durante 2 horas, transcurrido los cuales se centrifuga a 10000 x g durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, el precipitado se resuspende en 50 ml de Tris-HCl, pH 7,5 y se procede a dializar la solución con una membrana de celulosa durante 48 horas a 4°C en 20 volúmenes del mismo tampón, cambiando el tampón cada 12 horas. Posteriormente, el dializado se centrifuga a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante donde se encuentra la PKA. Se preparan alícuotas de 200 μl y se guardan a -20 °C.

➤ Titulación de la proteína quinasa A:

Es necesario valorar la capacidad de unión de la PKA al ^3H -AMPc en presencia de cantidades crecientes de AMPc frío, para lo cual procedemos a una titulación de la PKA. Con este fin, se preparan varias diluciones:

Tabla 10: Diluciones de PKA y concentraciones de AMPc frío.

Diluciones PKA	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/50
----------------	------	------	------	------	------	------

Concentraciones crecientes de AMPc frío (pmol/ml)	5	10	20	30	50	100	150	300
---	---	----	----	----	----	-----	-----	-----

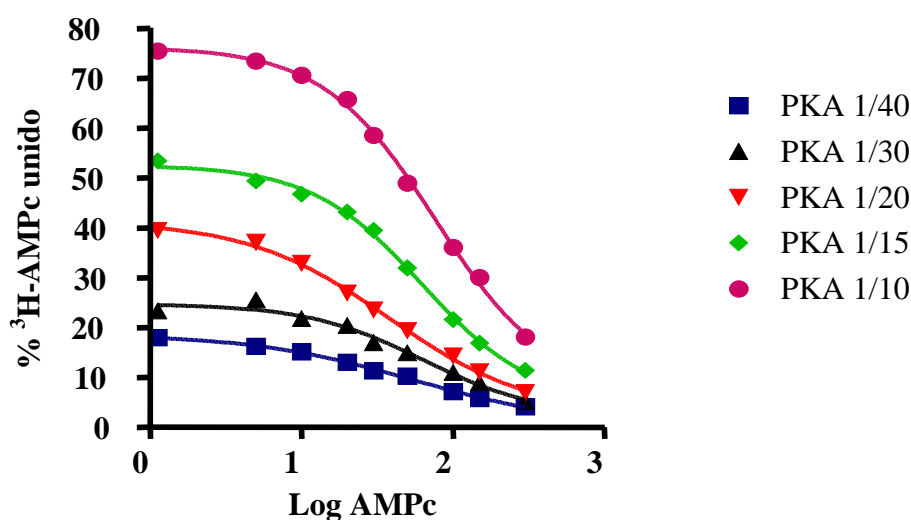


Figura 32: Curvas de desplazamiento de la unión de ^3H -AMPc a la PKA a diferentes diluciones de la misma. Tomado de la tesis de Alberto Hernández Pinto.

➤ Suspensión de carbono activo:

Con objeto de separar el ^3H -AMPc que no se ha unido a la PKA, se prepara una suspensión de carbono activo 2,5% (p/v) y BSA 2% en tampón fosfato 0,05 M pH6,5.

Método

Para la realización del experimento, se incuban 20 μl de membranas de hipocampo a una concentración de 0,3 mg/ml suspendidas en TEA 25 mM pH, 7,4 en un volumen final de 100 μl que contiene:

Tabla 11: Volúmenes a utilizar para adenilato ciclasa.

Tubo	10 μ l	10 μ l	50 μ l
1,2 (Actividad total)	TEA 25 M	TEA 25 mM+ 0,1 BSA	Cóctel
3,4 (Inhibición de la actividad total)	TEA 25 M	SST 10^{-4} M	Cóctel
5,6 (Actividad estimulada)	FK 10^{-5} M	TEA 25 mM + 0,1 BSA	Cóctel
7,8 (Inhibición de la actividad estimulada)	FK 10^{-5} M	SST 10^{-4} M	Cóctel

La reacción comienza cuando se añaden de manera seriada 10 μ l de ATP a los tubos previamente atemperados (4-5 minutos). Tras una incubación de 15 minutos a 30 °C en un baño con agitación, se detiene la reacción desnaturalizando las proteínas a 90 °C durante 3 minutos. Se dejan enfriar los tubos y se añaden 200 μ l de la suspensión de alúmina, agitando en vórtex. Posteriormente, se centrifugan los tubos a 3200 x g durante 10 minutos a 4°C y a continuación, se diluyen los sobrenadantes de las muestras (con medio de dilución) para poder realizar la interpolación en la curva de calibrado. Las diluciones recomendadas para el lote de PKA con el que se trabajó, fueron las siguientes:

- Basales e inhibidas de las basales: dilución 1/3
- Estimuladas e inhibidas de las estimuladas: dilución 1/15

Se toman 50 μ l de los sobrenadantes de la curva estándar y de las diluciones anteriores y se les añade 50 μ l de la PKA diluida, incubándolos 90 minutos a 4°C con el fin de conseguir la unión del AMPc a la PKA. A continuación, se añaden 50 μ l de ^3H -AMPc 6,25 mM y se incuban durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se añaden 150 μ l de la suspensión de carbón activo, excepto a los tubos de actividad total) y se mantienen los tubos a 4°C durante 15 minutos. Se centrifuga los tubos a 3200 xg durante 10 minutos a 4°C. Se toman 200 μ l del sobrenadante y se añaden a tubos de 3 ml opacos que contiene 2 ml de líquido de centelleo (OptiPhase HiSafeII) y por último, se efectúa el conteo de la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Wallac Pharmacia 1410).

13. MEDIDA DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Para medir el grado de peroxidación lipídica se realiza una valoración de los niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (ATB) siguiendo el método descrito por Ottolenghi (1959).

Reactivos

- Ácido tricloroacético (TCA) 10 %
- ATB 0,67%
 - Se disuelven 67 mg de ATB en 1ml de DMSO y se enrasa a 10 ml con agua bidestilada.
- 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMOP) 500 μ M
 - El TMOP se diluye previamente en 1 ml de etanol y posteriormente se enrasa a 50 ml con agua bidestilada.

Método

Se toman 100 μ l de la fracción soluble en tubos eppendorf y se le añaden 200 μ l de TCA 10 % frío con el fin de precipitar las proteínas. Se deja reposar la mezcla 20 minutos y, a continuación, se centrifuga 10 minutos a 11000 x g a 4°C. Paralelamente, se prepara la recta de calibrado con una solución de TMOP 500 μ M en agua bidestilada. Por último, se toman 200 μ l de cada patrón y de las muestras desproteinizadas y se añade un volumen de ATB 0,67 %. Se incuban los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos, se deja enfriar y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 535 nm. Los resultados obtenidos se expresan como μ M de malondialdehído relativizados a mg de proteína total.

14. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION

Los niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión total (GSH-t) se determinan utilizando el método descrito por Griffith (1980). Se trata de un método cíclico en el cual el GSSG se reduce enzimáticamente por la glutatión reductasa (GR) y NADPH para generar GSH, el cual reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB, ácido-5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB, de color amarillo) y un producto de transición formado por el GSSG y TNB (GSTNB). Este producto es nuevamente reducido por la GR y el NADPH para formar una molécula de TNB y regenerar GSH (**Figura 33**). La cantidad de TNB formado se mide espectrofotométricamente a 412 nm. Los resultados se extrapolan a una curva de calibrado realizada con concentraciones conocidas de GSH (0-200 μM). Para la determinación de los niveles de GSSG, es necesario retirar previamente el GSH que se encuentra en la muestra. Para ello, se añade a cada muestra 4'-vinil-pirimidina (4VP), que reacciona covalentemente con los grupos tiol reducidos. En este caso, para realizar la curva de calibrado, se añaden concentraciones conocidas de GSSG (0-20 μM).

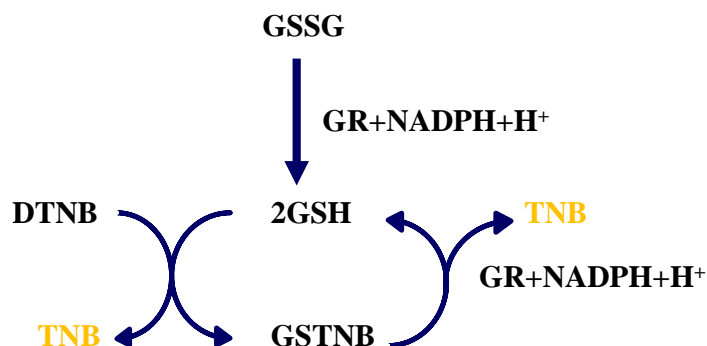


Figura 33: Representación de la reacción cíclica para la determinación de los niveles de glutatión. GSSG, glutatión oxidado; GSH, glutatión reducido, GR, glutatión reductasa; DTNB, 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico); TNB, ácido 5-tio-2-nitrobenzoico; GSTNB, producto de transición proveniente de la reacción del GSH con el DTNB.

Reactivos

- Tampón fosfato-EDTA pH 7,0:
 - Na_2HPO_4 100 mM
 - EDTA 1 mM
- Ácido tricloroacético (TCA) 20 % (p/v) en agua destilada

- GSH
- GSSG
- 4-Vinil pirimidina (4-VP) 1M (disuelta en etanol)
- Glutation reductasa (GR)
- NADPH
- DTNB
- Solución de ensayo
 - NADPH 0,30 mM
 - DTNB 0,225 mM
 - GR 3,75 UL/ml
- NaOH 4N

Método

14.1. EXTRACCIÓN DEL GLUTATION

La determinación de los niveles de glutatión se realiza en la fracción citoplasmática. Para evitar la interferencia con otras proteínas, se procede a la retirada de proteínas. Se toman 100 µl de citoplasma y se le añaden 100 µl de TCA 20 %. Se dejan reposar los tubos 20 minutos en hielo y posteriormente se centrifugan a 11000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se recogen los sobrenadantes y se almacenan en tubos eppendorf a -80 °C hasta el momento del ensayo.

14.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION TOTAL (GSH-T)

Se prepara un curva de calibrado con concentraciones crecientes de GSH (0-200 µM) en agua destilada y, a continuación, se añade a cada tubo un volumen de TCA 20%. Se toma un alícuota de cada tubo de la curva y se diluye 1/50 con tampón fosfato/EDTA para medir el GSH-t. El ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos. Se añaden 50 µl de cada patrón y de cada muestra por duplicado. Posteriormente se añaden 100 µl a cada pocillo de la solución de ensayo con una pipeta multicanal. Se incuba la placa 5 minutos a 37 °C y se lee la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas a 412 nm.

14.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION OXIDADO (GSSG)

Se prepara una curva de calibrado con concentraciones crecientes de GSSG (0-20 μ l) en agua bidestilada y, posteriormente, se le añade un volumen de TCA 20 %. Se toma una alícuota de las muestras y de cada tubo de la curva y se diluye a la mitad con tampón fosfato/EDTA que contiene 4-VP a una concentración 100 veces mayor que el de GSH-t medido anteriormente, siguiendo las instrucciones del apartado anterior (**sección 14.2**) y NaOH a una concentración final de 0,2 N. Los tubos se incuban 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se prepara una placa de 96 pocillos y se procede de la misma manera que la descrita en el apartado anterior para conocer la cantidad de GSH.

15. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATION REDUCTASA Y DE LA GLUTATION PEROXIDASA

La determinación de la actividad enzimática de las enzimas del sistema de la glutation se realiza con ayuda de dos kits comerciales de la casa BioVision. El principio que permite determinar la actividad de la glutation reductasa, es por el método cíclico descrito en el apartado anterior (**sección 14**), en el cual el GSSG es reducido enzimáticamente por la glutation reductasa (GR) con ayuda de NADPH generándose GSH que reacciona posteriormente con el DTNB. La determinación de la actividad de la glutation peroxidasa también corresponde el método cíclico en el cual el GSH es oxidado a GSSG, por la glutation peroxidasa, mientras se reduce el hidróperóxido cumene.

15.1 DETERMINACIÓN DE LA GLUTATION REDUCTASA

Reactivos

- Tampón de ensayo GR
- H_2O_2 3 %
- Catalasa
 - La catalasa liofilizada se reconstituye con 1ml de tampón de ensayo
- Estándares de TNB (2,5 μ mol)
 - Los estándares de DTNB se reconstituyen con 0,25 ml de tampón de ensayo preparando una concentración stock de 5 mm

➤ DTNB

- La solución de DTNB se reconstituye con 0,45 ml de tampón de ensayo.

➤ NADPH-GneratTM

- NADPH-GeneratTM se reconstituye con 0,22 ml de tampón de ensayo

➤ GSSG

- Reconstituido con 1,3 mililitros de la solución de ensayo.

➤ Control positivo de GR.

Método

La determinación de la actividad enzimática se realiza en la fracción citoplasmática. Primero, se prepara la curva estándar con concentraciones conocidas de TNB a partir de una concentración stock de 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ (0, 10, 20, 30, 40, 50 nmol/pocillo) en tampón de ensayo y se añaden a una placa de 96 pocillos. El volumen final en cada pocillo ha de ser 100 μl . A continuación se añaden 50 μl de la muestra por duplicado y 50 μl de tampón de ensayo. Posteriormente se prepara el coctel de reacción que contiene por muestra:

Tabla 12: Volumen de los reactivos para la determinación de la actividad glutathion reductasa

Volumen	Reactivo
40 μl	Tampón de enzima
2 μl	Solución de DTNB
2 μl	NADPH-Gnerat TM
6 μl	Solución de GSSG

Se añade a cada pocillo 50 μl del coctel de reacción. Inmediatamente, se realiza la lectura de la cinética enzimática en un espectrofotómetro a 405 nM durante 20 minutos a 25°C. El cálculo de la actividad enzimática se lleva a cabo con la siguiente expresión:

Actividad Glutathion reductasa= Concentración TNB (interpolada en la curva)

$\text{Tiempo}_{\text{final}} - \text{Tiempo}_{\text{inicial}} \times \text{volumen} \times 0,9 \times \text{volumen de muestras}$

15.2. DETERMINAR DE LA ACTIVIDAD GLUTATION PEROXIDASA.

Reactivos

- Tampón de enzima
- NADPH
 - Reconstituido con 0,5 ml de agua bidestilada a una concentración final de 40 mM.
- ✓ Glutation reductasa
 - Reconstituida con 0,22 ml de tampón de ensayo.
- ✓ Peróxido de hidrógeno cumene
- ✓ Control positivo de glutathione peroxidase.

Método

Al igual que en el apartado anterior, la determinación de la actividad enzimática se realiza en fracción citoplasmática utilizando un placa de 96 pocillos. Se prepara una curva de calibrado con concentraciones conocidas de NADPH partiendo de una concentración stock de 1mM (0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/ pocillo) el volumen final en cada pocillos es de 100 μ l. Se añaden 50 μ l de cada muestra por duplicados a la placa y se añade 50 μ l de tampón de muestras. Posteriormente se prepara un coctel de reacción que contiene por cada muestra:

Tabla 13: Volumen de los reactivos para la determinación de la actividad glutathione reductase.

Volumen	Reactivo
33 μ l	Tampón de ensayo
3 μ l	NADPH 40 mM
2 μ l	Solución de glutathione reductase
2 μ l	GSH

A cada una de las muestras y a la curva de calibrado se añaden 40 µl del coctel de reacción y se incuban 15 minutos con el fin de eliminar todo el GSSG que hay en las muestras. A continuación se añaden 10 µl del hidroperóxido cumene para que comience la reacción. Inmediatamente se realiza la lectura de la cinética de la actividad enzimática en un espectrofotómetro a 340 nm.

Para calcular la actividad enzimática se utiliza la siguiente ecuación:

Actividad glutatión peroxidasa= Cantidad de NADPH (interpolado en la curva)

$$\text{Tiempo}_{\text{final}} - \text{Tiempo}_{\text{inicial}} \times \text{volumen} \times 0.9 \times \text{volumen muestra.}$$

16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA (CAT)

Para medir la actividad CAT se utiliza una modificación del método de Aebi y col. (1984). El principio de esta técnica se basa en la disminución de la absorbancia a 240 nm. que se produce por la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) por la acción de la catalasa.

Reactivos

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0
- H_2O_2

Método

Para la realización del experimento es necesario hacerlo en oscuridad o bajo luz roja. Se toman 100 µl de fracción citoplasmática y se le añaden 900 µl de PBS, a continuación se añade 1 ml de H_2O_2 y se mide la absorbancia a 240 nm. durante 5 minutos. Para descartar la descomposición espontánea del H_2O_2 , se utilizan 100 µl de agua destilada en 900 µl de PBS y se le añade 1 ml de H_2O_2 . Para calcular la actividad de la enzima catalasa se analiza la disminución de la absorbancia ($-\Delta\text{Abs}$) que recibe el nombre de “k”. La actividad CAT se expresa como k/mg de proteína.

17. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La medida de la actividad de la SOD se realiza siguiendo el método descrito por Minami y Yoshikawa (1979). La autooxidación en medio básico del pirogalol genera radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que va a reducir el azul de nitrotetrazolio (colorante amarillo NTB) a azul de formazan, de color azul. La presencia de SOD en el medio transforma el radical superóxido en H_2O_2 , evitando así la reducción del NTB (**Figura 34**). Por lo tanto, en este método se mide la inhibición en la formación de azul de formazan mediante espectrofotometría a 540 nm. frente a un inespecífico. Se considera como unidad de actividad de la SOD a la actividad enzimática capaz de producir una 50% de inhibición sobre la reducción del NTB, según la definición de McCord y Fridovich (1969).

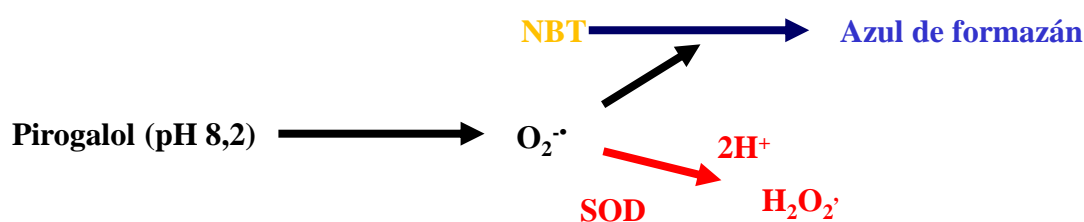


Figura 34: Esquema de la reacción del radical superóxido con el azul de nitrotetrazolio (NTB).

Reactivos

- ✓ Etanol
- ✓ Cloroformo
- ✓ Tris 1M
- ✓ HCl 1M
- ✓ Tampón Tris-cacodílico pH 8,2
 - Cacodílico sódico 1 %
 - Ácido dietilentriaminotetraacético (DPTA) 1,6 mM
 - El pH de la solución se ajusta con Tris 1 M. Se prepara en el momento de realizar el experimento.
- ✓ Solución de pirogalol 3,6 mM (disuelto en HCl 1 M)

- ✓ Solución Triton X-100 al 16 % (en agua bidestilada)
- ✓ Solución de cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) 0,98 mM
- ✓ Solución de parada pH 3,5
 - Ácido fórmico 2 M
 - Tritón X-100 1,5 %
 - El pH de la solución se ajusta con ácido fórmico y se guarda en frío.

Método

17.1. EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA

Se utiliza la fracción citoplasmática para la realización del experimento. A 200 µl de muestras o de agua (para los inespecíficos) se añaden 300 µl de agua bidestilada. A continuación, se añaden 500 µl de etanol frío y 250 µl de cloroformo, agitando la mezcla en un vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugan las muestras a 18000 x g durante 1 hora a 4°C. Se transfiere la fase superior a tubos eppendorf limpios conservándolos a -20 °C hasta el momento del ensayo.

17.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La medida de la actividad de la SOD ha de realizarse en oscuridad o bajo luz roja, en hielo y con triplicados por cada muestra. Se preparan tubos en los que se añade:

Tabla 14: Volúmenes de reactivos para determinar la actividad SOD.

Volumen	Reactivo
500 µl	Tris-Cacodílico
100 µl	Tritón X-100 16%
150 µl	Muestras o H ₂ O (en los inespecíficos)
250 µl	Solución de NBT

La reacción se inicia cuando se añaden 10 µl de la solución de pirogalol diluida 1:1 con agua bidestilada y se agita. Se hace una primera medida de la absorbancia a 540 nm. en el espectrofotómetro y, seguidamente, se incuba el tubo durante 5 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se añade 100 µl de la solución de parada, se agita el tubo en el vórtex y se vuelve a medir a 540 nm.

18. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE TEJIDO CEREBRAL

El análisis inmunohistoquímico (IHQ) es un método para detectar *in situ* antígenos celulares en tejidos basado en reacciones inmunoenzimáticas usando anticuerpos mono- o policlonales. Existen diferentes técnicas de inmunohistoquímica que pueden clasificarse en directas o indirectas. En las técnicas directas, el anticuerpo específico está conjugado con un marcador. En las técnicas indirectas se emplea un anticuerpo primario (no marcado) y un anticuerpo secundario marcado.

Para la realización de esta técnica se utilizaron secciones transversales de cerebros de ratas.

Reactivos

- Parafina
- Formol tamponado (10% Formaldehído en PBS)
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,0
- Etanol 50%, 60%, 70%, 90%, 100 %
- N-butanol
- Xileno
- Portaobjetos tratados con 3-aminopropil-trietoxisilano (Merck)
- Agua estéril
- H₂O₂ al 0,3%
- Anticuerpos primarios
- Anticuerpos secundarios unidos a: biotina, sistema MaxVision® (polímero-peroxidasa, Master Diagnóstica), peroxidasa, fosfatasa alcalina (ambos de Chemicon), en función de la técnica
- Hematoxilina de Caracci

- Estreptavidina-biotina-peroxidasa, estreptavidina-biotina-fosfatasa alcalina (Dako)
- Kit de revelado MaxVision-diaminobencidina (Master Diagnostica); Kit de revelado AP-red (Zymed)
- Tampón de bloqueo (en TBS)
 - ✓ Suero de burro (NDS) al 3%
 - ✓ Tritón X-100 al 0,05%
- Tampones para la recuperación antigénica
 - ✓ Citrato 0,01M pH 6,0
 - ✓ Tris-EDTA pH 9,0
 - Tris 10mM
 - EDTA 1mM
- Medio de montaje dimetilfeniltalato-poliestireno-xileno (DPX)

Método

Se extrae el cerebro de las ratas conforme se ha descrito en la **sección 6.1**. Los ensayos de inmunohistoquímica, se realizan con tejido cerebral incluido en parafina. Para la inclusión en parafina, primero se realiza una deshidratación del tejido con alcohol en porcentajes crecientes (50%-100%) y después, se sustituye el etanol con N-butanol (3 cambios, 3h cada uno). Posteriormente, las muestras se infiltran con parafina a 58°C (3 cambios, 2h cada uno). Tras depositar las muestras en moldes llenos de parafina, se enfrían los mismos se obtiene el bloque con la pieza incluida. De cada muestra se obtuvieron secciones seriadas de cinco micras con un micrótomos MICROM HM 330. Posteriormente, los cortes se montan sobre portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltrieoxilano (TESPA) al 2% en acetona. A continuación, se desparafina el tejido con xilol. Se procede a la rehidratación, introduciendo los cortes de tejido en concentraciones decrecientes de alcohol (del 100% al 70%).

Para detectar proteínas en cortes de tejido, es necesario realizar una recuperación antigénica. Dicha recuperación consiste en desenmascarar epítomos que han sido enmascarados previamente por el paraformaldehído. Para exponer los antígenos, los cortes se incuban en tampón citrato 0,01 M (pH=6) o en Tris-EDTA (10 mM Tris,

1mM EDTA) (pH=9), en función del tipo de anticuerpo que se utilice, durante 2 minutos en una olla exprés convencional y se dejan enfriar en la olla sin destapar durante 20 min. Posteriormente, se lavan 5 minutos con agua destilada.

La actividad peroxidasa endógena se inhibe incubando los cortes durante 20 minutos con H₂O₂ al 0,3% a temperatura ambiente. A continuación, se lavan 5 minutos con agua destilada y 5 minutos con TBS. Para bloquear las uniones no específicas del anticuerpo primario al tejido, se incuban los cortes con tampón de durante 20 min. Posteriormente, los cortes se incuban con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche, siguiendo las diluciones de la **Tabla 15**. Al día siguiente, las muestras se lavan dos veces con TBS durante 10 minutos y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente durante 20 minutos (sistema MaxVision y conjugados con biotina) y 1 hora (secundarios unidos a HRP o AP) Posteriormente, se vuelven a lavar para retirar el exceso de anticuerpo y se revela la actividad enzimática. En el caso de realizar marcajes dobles, después de lavar con TBS se procede a bloquear los cortes con suero de burro durante 20 min y se repite el proceso con el otro anticuerpo primario, cambiando el enzima y el cromógeno del sistema de detección. Quitar Los núcleos son teñidos posteriormente hematoxilina de Caracci. Para terminar, se deshidratan las secciones, se aclaran con xilol y se coloca un cubreobjetos con DPX, o se procede al montaje de la preparación utilizando un medio de montaje acuoso, en el caso de que se hubiere empleado fosfatasa alcalina como método de detección.

Tabla 15: Diluciones de anticuerpos primarios para la inmunohistoquímica

Anticuerpo	Dilución
CD3	1/1000
CD8	1/1000
Iba-1	1/1500
IgG	1/200
GFAP/PCNA	1/1000 1/2000
SSTR2	1/1000

19. TECNICA DE COLORACIÓN DE VAINAS DE MIELINA

Para la coloración de vainas de mielina se procede a realzar de manera combinada la tinción Luxol fast blue, que permite colorear los fosfolípidos y a continuación se realiza la técnica de PAS para teñir carbohidratos y proteínas.

Reactivos

- Cortes embebidos en parafina de 5µm
- Solución Luxol fast blue (0,1%)
 - ✓ Luxol fast blue 0,5g
 - ✓ Alcohol de 96° 500ml
 - ✓ Ácido acético glacial 10%
- Carbonato de litio al 0,5%
- Alcohol etílico al 70%
- Ácido peryódico
- Reactivo de Schiff

Método

Las secciones desparafinadas se incuban toda la noche con luxol fast blue a 60°C. Al día siguiente se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se sumergen brevemente en la solución de carbonato de litio para comenzar la diferenciación entre sustancia gris y sustancia blanca. Se continúa diferenciando las dos áreas realizando lavados con alcohol de 70°, hasta que se diferencie claramente. Posteriormente se lava con agua destilado 5 minutos y se procede a realizar la tinción de PAS (6 minutos de incubación con ácido periódico, lavados en agua destilada, 10 minutos de incubación con el reactivo de Schiff y lavados en agua destilada). A continuación se tiñen los núcleos con hematoxilina durante 1 minuto. Para terminar se retira el exceso de hematoxilina lavando los cortes con agua y se procede a la deshidratación (rápida, a partir de etanol al 90%), aclarado y montaje montarlo con medio de montaje acuoso.

20. DETERMINACIÓN DE NUCLEOS APOPTÓTICOS IN SITU

Para marcar apoptóticos de tejido cerebral, se usa la técnica del TUNEL (marcage del extremo 3'-OH libre por la desoxinucleotidil transferasa terminal), descrita por Gavrieli y col. (1992). Esta técnica se basa en la capacidad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (dTTP), de añadir nucleótidos al extremo 3'-OH terminal de una cadena de oligonucleótidos. Dado que durante la apoptosis núcleos se produce una fragmentación del ADN por la acción de las endonucleasas, las células apoptóticas poseen un alto número de extremos 3'-OH libres sobre los que puede actuar la dTTP. Para la realización de esta técnica, se utilizan nucleótidos marcados con fluoresceína para ser visualizados en un microscopio de fluorescencia.

Reactivos

- Kit de detección *DeadEnd Fluorometric Tunel System* (Promega)
- 1% de metanol-formaldehído diluido en tampón fosfato salino (PBS)
- Metanol 4%
- Proteinase K 20µg/ml
- Mezcla de reacción

- ✓ Mezcla de nucleótidos marcados con fluoróforo
- ✓ Enzima rdTT
- ✓ Tampón de equilibrado (proporcionado por la casa comercial)
- Hematoxilina de Harris
- Medio de montaje DePeX

Método

El análisis de núcleos apoptóticos se realiza siguiendo las indicaciones de la casa comercial Promega. Tras desparafinar e hidratar las secciones se lavan con una solución de NaCl al 0,85% a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se realiza una digestión del tejido durante 7 minutos con proteinasa K a una concentración de 20 µg/ml diluido 1:500 en PBS. Después, se lava el tejido dos veces con PBS durante 5 minutos. Las muestras se incuban con la mezcla de reacción durante 1 hora a 37 C°. A continuación, se lavan los tejidos dos veces con agua bidestilada. Para la detección con cromógenos, se incuban las muestras durante 30 minutos con anticuerpo secundario anti-fluoresceína unido a peroxidasa (DAKO) diluido 1:300 en solución de bloqueo, y la actividad enzimática se detecta mediante revelado con DAB.

Para contrastar los cortes, se sumergen los portaobjetos en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos y se lavan con agua corriente hasta que se eliminan los restos de colorante. A continuación, se procede a deshidratar los cortes sumergiéndolos primero en etanol de 96° durante 10 minutos y, a continuación, en etanol absoluto otros 10 minutos. Por último, se sumergen los portaobjetos en xileno durante 10 minutos, se montan con DePeX. Las muestras se valoran en un microscopio óptico

21. EVALUACIÓN DE LOS DATOS HISTOLÓGICOS

La evaluación de los cortes histológicos de células TUNEL (+) y subpoblaciones linfocitarias de células T se realizó mediante el conteo de cinco a diez campos por área cerebral de cada rata en cortes seriados de cerebro. Cada grupo experimental estaba formado por cinco animales distintos.

La evaluación de las células Iba-1 y la señal para IgG se realizó mediante un sistema de gradación subjetiva, desde la intensidad nula de marcaje (-) hasta la

intensidad máxima (+++). Esta evaluación fue realizada por dos observadores independientes.

Posteriormente, los grados de intensidad obtenidos fueron agrupados en distintos niveles de expresión, para su posterior análisis e interpretación, siguiendo la escala de gradación de la **Tabla 16**.

Tabla 16: Agrupación en niveles de los grados de intensidad de la señal

Intensidad de la Señal	Grados de intensidad del marcaje
Nula (0)	-
Baja (1)	-/+, +
Moderada (2)	+/++, ++
Alta (3)	++/+++, +++

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de todos los datos se realizó con el programa informático GraphPad Prism de GraphPad Software Inc. Los valores están indicados como la media \pm error estándar. Los análisis estadísticos empleados son: Bonferroni para la evaluación de los datos obtenidos en los análisis histológicos y la *t de Student* para el resto de determinaciones. Para la comparación de los parámetros, los resultados se consideraron significativo * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ dependiendo de los ensayos.

23. GESTOR BIBLIOGRÁFICO

Para la realización de esta memoria se ha utilizado el programa EndNote web como gestor bibliográfico y se ha utilizado el estilo de la revista Neuroscience.

Resultados

*“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Su deber es sentar las bases
para aquellos que están por venir, y señalar el camino”
[Nicola Tesla]*

A. EVOLUCIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL CRÓNICA RECIDIVANTE Y EL EFECTO DE UNA SAL DE FOSFATO DE ETANOLAMINA

En este primer bloque de resultados, se expone la evolución de los signos clínicos de la EAE-CR así como el efecto de la sal de fosfato de etanolamina en dicha evolución. Para ello, se valoró diariamente el curso de la enfermedad siguiendo los siguientes criterios:

- Grado 0: No hay signos clínicos de la enfermedad
- Grado 1: Flacidez de la cola
- Grado 2: Parálisis de la cola y dificultad al moverse
- Grado 3: Parálisis de las patas posteriores
- Grado 4: Parálisis de las patas posteriores e incontinencia fecal y urinaria

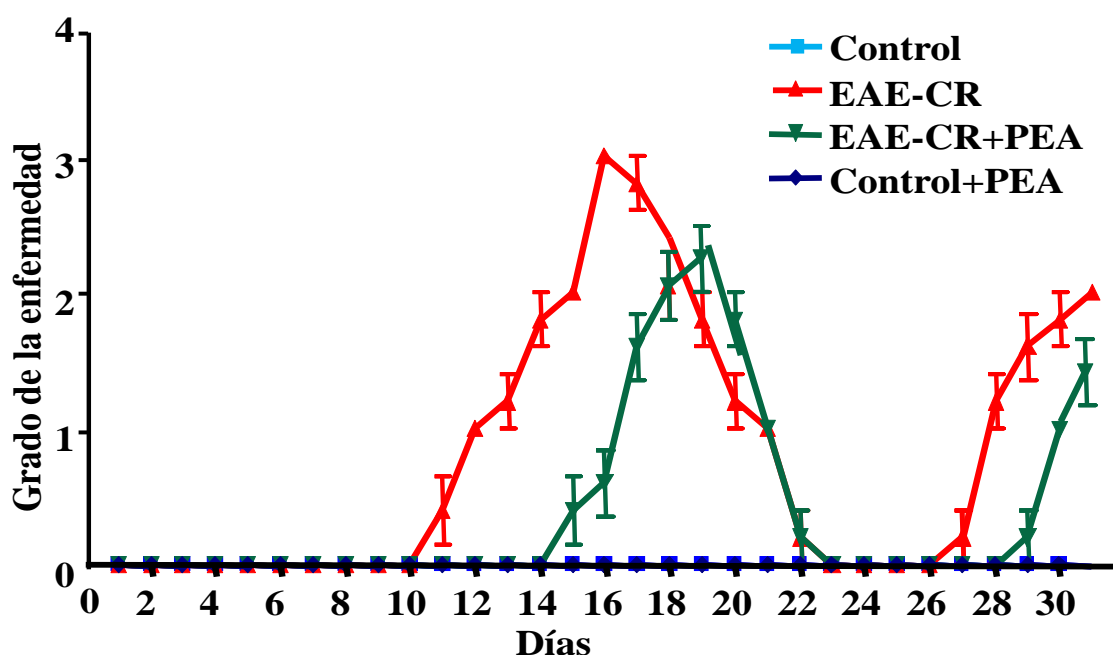


Figura 35: Evolución de los signos clínicos de la enfermedad a lo largo del tiempo

En este modelo animal de EM, la EAE-CR, el 100% de las ratas Lewis inmunizadas con GPSC mostraron los primeros signos de la enfermedad entre los días 10-12 posteriores a la inmunización, mientras que los signos más severos se manifestaron en el día 17, como se puede ver en la **Figura 35**. En las ratas con EAE-CR pretratadas con la sal de PEA (EAE-CR+PEA), se observó que un 5% de las ratas no muestran signos clínicos de la enfermedad y el 95% restantes presentan un retraso en la aparición de los signos clínicos en comparación con las ratas EAE-CR, manifestándose los signos más severos de la enfermedad entre los días 19-20 posteriores a la inmunización. Por otro lado, tanto las ratas con EAE-CR como las ratas EAE-CR+PEA se recuperaron del brote alrededor del día 22 posterior a la inmunización, lo que muestra un acortamiento en la duración del primer brote en las ratas con EAE-CR+PEA. Los signos clínicos del segundo brote de la enfermedad se observaron entre los días 26-27 en las ratas con EAE-CR, y entre los días 28-30 en las ratas con EAE-CR+PEA.

El análisis de las ratas en los distintos grados de la enfermedad muestra que el 3,52% de las ratas con EAE-CR se quedan en el grado 1, mientras que ninguna rata se queda en grado 2 y el 96,48% de las ratas alcanzan el grado 3 de la enfermedad. Sin embargo solo el 19,04% de las ratas con EAE-CR+PEA alcanzan el grado 3, como muestra la **Tabla 17**.

Tabla 17: Porcentaje de ratas en los distintos grados de la enfermedad

	Grado 1	Grado 2	Grado 3
EAE-CR	3,52%	0%	96,48%
EAE-CR+PEA	38,09%	38,09%	19,04%

Otro parámetro utilizado para valorar el curso de la enfermedad fue un análisis diario del peso corporal (**Figura 36**). Los resultados muestran que la aparición de los signos clínicos se correlacionan con una disminución del peso de los animales, tanto en las ratas con EAE-CR como en las ratas con EAE-CR+PEA.

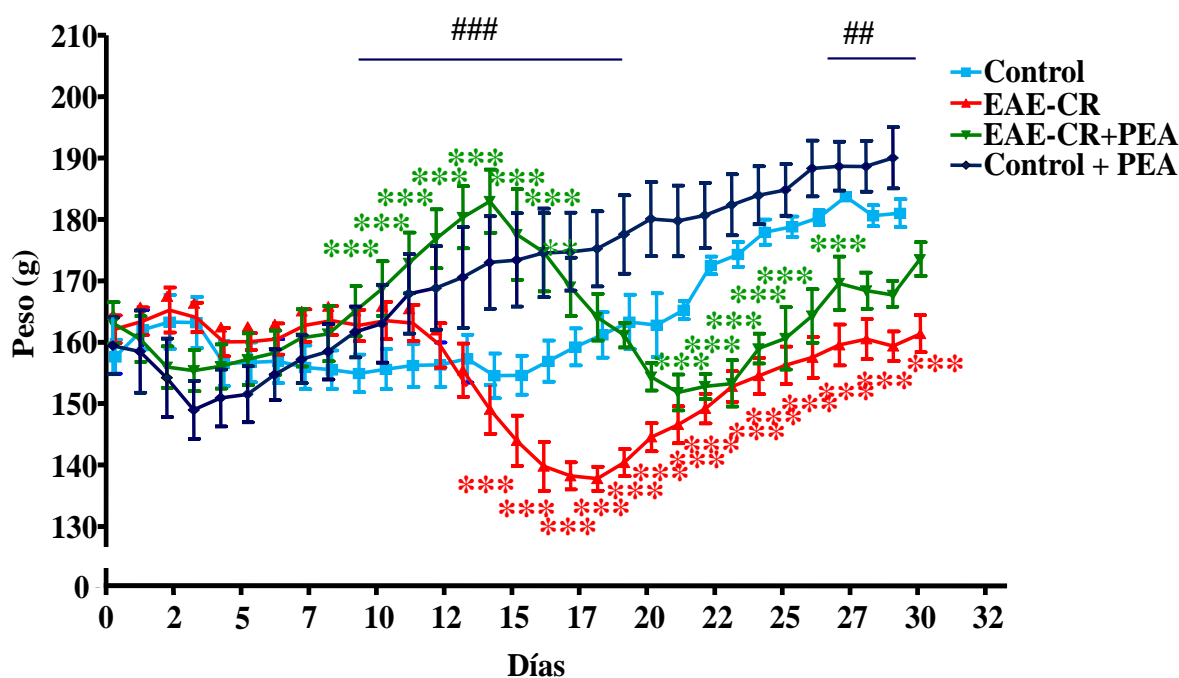


Figura 36: Evolución del peso de las ratas a lo largo de la enfermedad. Los resultados se presentan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. Comparación estadística respecto al control: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. Comparación estadística entre EAE-CR y EAE-CR+PEA: ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$.

El siguiente paso fue comprobar si la disminución del peso de los animales se correlacionaba con una disminución de la ingesta.

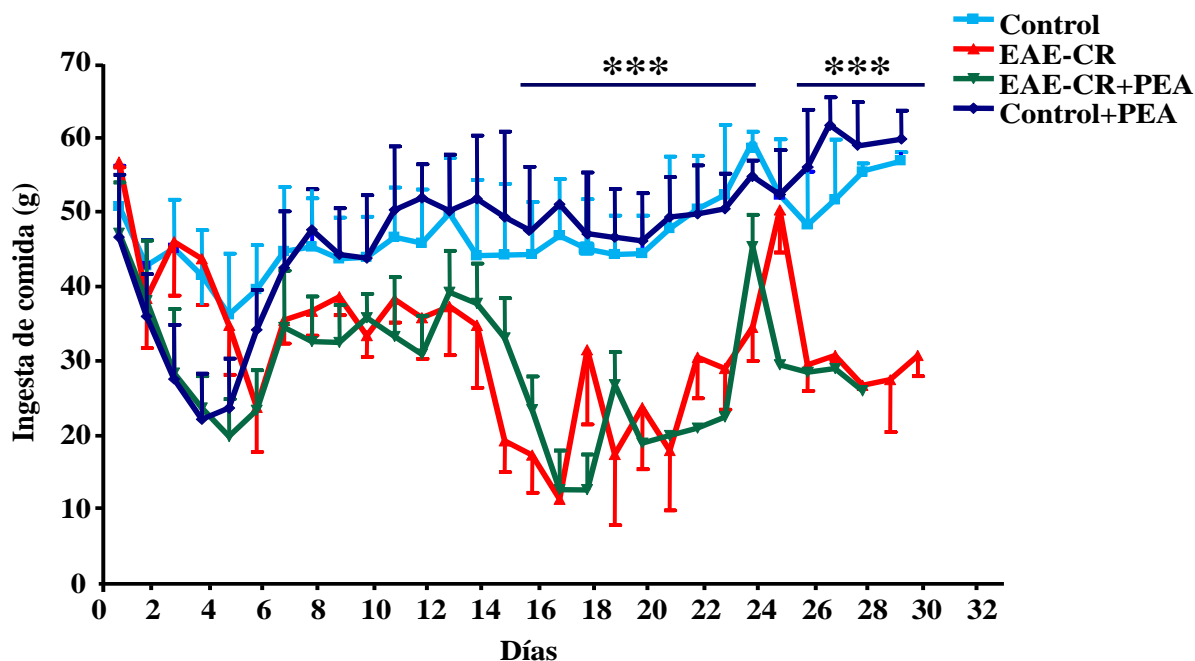


Figura 37: Evolución de la ingesta a lo largo de la enfermedad. Los resultados se presentan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. Comparación estadística de ratas con EAE-CR y ratas con EAE-CR+PEA respecto al control: *** $p < 0,001$.

La **Figura 37** muestra que alrededor del día 12-14 posterior a la inmunización, las ratas con EAE-CR así como las ratas con EAE-CR+PEA presentan una disminución en la ingesta de comida en comparación con las ratas control y control+PEA. Esta disminución de la ingesta coincide con la disminución del peso y la aparición de los primeros signos clínicos de la enfermedad.

B. SISTEMA INMUNOLÓGICO

B.1. SANGRE PERIFÉRICA

En este bloque, se exponen los resultados del estudio del sistema inmunológico en las ratas con EAE-CR y el posible efecto de la sal de PEA en el mismo. En primer lugar, se valoraron las poblaciones linfocitarias en sangre periférica. Para ello, nos propusimos valorar, por citometría de flujo, las poblaciones de linfocitos T, B y NK, ya que se cree que son los tipos linfocitarios que desencadenan esta patogenia. El estudio inmunofenotípico de las poblaciones de linfocitos T ($CD3^+$) muestra que en las ratas con EAE-CR, hay una disminución del número total de células T en los tres periodos de la enfermedad en comparación con las ratas control (**Tabla 18**). Además, los resultados muestran una disminución del número de células Tc ($CD8^+$) en el primer brote de dicha enfermedad. Asimismo, se detectan cambios en el número de células B en las ratas con EAE-CR, tanto en el primer brote como en el segundo (**Tabla 19**). Por otro lado, los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de los niveles de células NK en sangre periférica en los tres periodos de la enfermedad, tanto en las ratas con EAE-CR como en las ratas pretratadas con PEA (**Tabla 19**).

Tabla 18: Poblaciones de linfocitos T en sangre periférica en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados representan el porcentaje de células T (CD3⁺) respecto a las células mononucleares aisladas de sangre periférica y los porcentajes de poblaciones subfenotípicas dentro de las células T. Los valores se expresan como la media del porcentaje \pm E.S.M. de diez experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: *p<0,05, ***p<0,001.

Tipo celular	Grupos	Primer brote	Entre brotes	Segundo brote
% de células T (CD3 ⁺) respecto a células mononucleares	Control	62,03 \pm 1,85	68,16 \pm 1,06	64,72 \pm 5,21
	EAE-CR	54,10 \pm 2,58*	55,92 \pm 1,84***	54,84 \pm 3,22*
	EAE-CR+PEA	52,32 \pm 5,16	63,18 \pm 1,95	57,38 \pm 2,05
	Control+PEA	64,93 \pm 2,28	65,98 \pm 1,83	62,58 \pm 3,09
% de células T (CD3 ⁺) que son CD4 ⁺	Control	78,80 \pm 1,02	80,34 \pm 0,61	78,01 \pm 0,85
	EAE-CR	85,02 \pm 1,67*	80,64 \pm 0,96	79,98 \pm 0,77
	EAE-CR+PEA	78,25 \pm 1,44	78,98 \pm 0,87	76,56 \pm 0,69
	Control+PEA	77,80 \pm 2,71	79,82 \pm 0,90	78,34 \pm 0,87
% de células T (CD3 ⁺) que son CD8 ⁺	Control	21,20 \pm 1,02	19,66 \pm 0,61	22,01 \pm 0,85
	EAE-CR	15,01 \pm 1,67*	19,36 \pm 0,96	21,02 \pm 0,77
	EAE-CR+PEA	21,73 \pm 1,44	21,02 \pm 0,87	23,44 \pm 0,69
	Control+PEA	22,10 \pm 2,71	20,18 \pm 0,90	21,66 \pm 0,87
Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Control	3,17 \pm 0,52	4,11 \pm 0,16	3,13 \pm 0,17
	EAE-CR	6,27 \pm 1,68*	4,22 \pm 0,27	3,78 \pm 0,18
	EAE-CR+PEA	3,74 \pm 0,47	3,79 \pm 0,21	3,28 \pm 0,12
	Control+PEA	3,91 \pm 0,81	3,99 \pm 0,21	3,64 \pm 0,17

Tabla 19: Poblaciones de linfocitos B y NK en sangre periférica en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se expresan como porcentaje de células B y NK respecto a las células mononucleares aisladas de sangre periférica y representan la media \pm E.S.M de diez experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tipo celular	Grupos	Primer brote	Entre brotes	Segundo brote
Linfocitos B	Control	13,37 \pm 1,38	13,05 \pm 0,87	11,84 \pm 0,94
	EAE-CR	19,74 \pm 3,24*	15,58 \pm 1,67	15,46 \pm 1,05*
	EAE-CR+PEA	15,92 \pm 2,56	11,48 \pm 1,79	12,96 \pm 1,11
	Control+PEA	16,01 \pm 2,50	14,32 \pm 1,02	11,55 \pm 0,96
Linfocitos NK	Control	3,57 \pm 0,28	3,96 \pm 0,20	3,24 \pm 0,27
	EAE-CR	21,15 \pm 3,65**	11,04 \pm 0,22***	12,02 \pm 2,05**
	EAE-CR+PEA	17,50 \pm 3,84*	11,10 \pm 1,40**	11,82 \pm 2,15**
	Control+PEA	6,69 \pm 1,24*	6,10 \pm 1,41	5,09 \pm 0,45*
% de células NK con receptores T	Control	2,31 \pm 0,13	2,29 \pm 0,31	2,08 \pm 0,21
	EAE-CR	1,77 \pm 0,12	1,83 \pm 0,27	1,50 \pm 0,16*
	EAE-CR+PEA	4,29 \pm 0,40*	2,39 \pm 0,21	2,28 \pm 0,32
	Control+PEA	3,14 \pm 0,43	2,74 \pm 0,59	2,38 \pm 0,15

B.2. BAZO

A continuación, nos propusimos valorar los niveles de células T, B y NK en un órgano linfóide como es el bazo. Los estudios de las poblaciones de linfocitos T muestran una disminución de dichas células en las ratas EAE-CR tanto en el primer brote como en el segundo. No se detectan diferencias significativas en las células B en las ratas con EAE-CR y con EAE-CR pretratadas con PEA respecto a las ratas control. En cambio, se observa un aumento de las células NK tanto en las ratas con EAE-CR

como en las ratas con EAE-CR+PEA en los tres periodos de la enfermedad (Tabla 20 y Tabla 21).

Tabla 20: Poblaciones de linfocitos T en el bazo de rata en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se expresan como porcentaje de células T (CD3⁺) respecto a las células mononucleares aisladas de bazo y los porcentajes de poblaciones subfenotípicas dentro de las células T. Los valores se expresan como la media del porcentaje \pm E.S.M. de diez experimentos independientes. Comparación frente el control: *p<0,05, **p<0,01.

Tipo celular	Grupos	Primer brote	Entre brotes	Segundo brote
% de células T (CD3 ⁺) respecto a las células mononucleares	Control	49,87 \pm 1,19	51,24 \pm 2,34	50,75 \pm 1,05
	EAE-CR	41,03 \pm 3,45*	45,46 \pm 3,46	44,38 \pm 3,59*
	EAE-CR+PEA	47,58 \pm 2,80	49,12 \pm 1,69	48,96 \pm 1,02
	Control+PEA	46,30 \pm 1,95	47,12 \pm 1,85	50,44 \pm 2,30
% de células T (CD3 ⁺) que son CD4 ⁺	Control	70,03 \pm 2,80	71,36 \pm 1,33	67,58 \pm 0,65
	EAE-CR	80,55 \pm 2,84*	81,42 \pm 2,49*	73,32 \pm 0,97**
	EAE-CR+PEA	71,10 \pm 2,89	79,36 \pm 1,72*	72,28 \pm 1,65*
	Control+PEA	69,23 \pm 3,54	74,36 \pm 1,09	69,62 \pm 1,37
% de células T (CD3 ⁺) que son CD8 ⁺	Control	29,98 \pm 2,80	28,64 \pm 1,33	32,43 \pm 0,65
	EAE-CR	19,45 \pm 2,84*	18,58 \pm 2,49**	26,68 \pm 0,97**
	EAE-CR+PEA	28,90 \pm 2,89	20,64 \pm 1,72**	27,72 \pm 1,65*
	Control+PEA	30,78 \pm 3,54	25,65 \pm 1,09	30,38 \pm 1,37
Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Control	2,49 \pm 0,32	2,49 \pm 0,12	2,08 \pm 0,06
	EAE-CR	4,14 \pm 0,79	4,38 \pm 1,11*	2,75 \pm 0,12
	EAE-CR+PEA	2,58 \pm 0,42	3,84 \pm 0,44*	2,61 \pm 0,21
	Control+PEA	2,39 \pm 0,41	2,90 \pm 0,18	2,29 \pm 0,15

Tabla 21: Poblaciones de linfocitos B y NK en el bazo de rata en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se expresan como porcentaje de células B y NK respecto a las células mononucleares aisladas de bazo y representa la media \pm E.S.M. de diez experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$.

Tipo celular	Grupos	Primer brote	Entre brotes	Segundo brote
Linfocitos B	Control	42,00 \pm 1,71	37,08 \pm 2,21	36,83 \pm 2,05
	EAE-CR	39,00 \pm 3,80	30,92 \pm 4,66	36,00 \pm 1,97
	EAE-CR+PEA	34,98 \pm 2,60	32,68 \pm 2,00	33,26 \pm 1,89
	Control+PEA	37,18 \pm 2,74	39,82 \pm 2,70	38,00 \pm 2,37
Linfocitos NK	Control	4,53 \pm 0,48	3,34 \pm 0,29	3,30 \pm 0,22
	EAE-CR	8,36 \pm 1,30*	6,53 \pm 1,30*	9,72 \pm 1,27*
	EAE-CR+PEA	7,53 \pm 0,95*	8,93 \pm 0,62*	10,41 \pm 1,46*
	Control+PEA	5,97 \pm 0,39	4,57 \pm 0,44	4,79 \pm 0,36*
% de células NK con receptores T	Control	8,15 \pm 1,12	7,02 \pm 0,25	8,47 \pm 0,90
	EAE-CR	4,99 \pm 0,94*	4,54 \pm 0,86*	5,18 \pm 0,54*
	EAE-CR+PEA	9,48 \pm 1,52	6,33 \pm 0,81	7,91 \pm 0,88
	Control+PEA	11,05 \pm 2,30	6,97 \pm 0,80	8,08 \pm 0,62

A continuación, dada las poblaciones linfocitarias encontradas en sangre periférica, se decidió analizar, mediante ELISA, los niveles de distintas citoquinas proinflamatorias en suero de rata en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados de la **Figura 38** muestran que los niveles de TNF- α en suero aumentan de manera significativa en el primer y segundo brote de la enfermedad, tanto en los grupos EAE-CR como en los grupos EAE-CR+PEA y control+PEA.

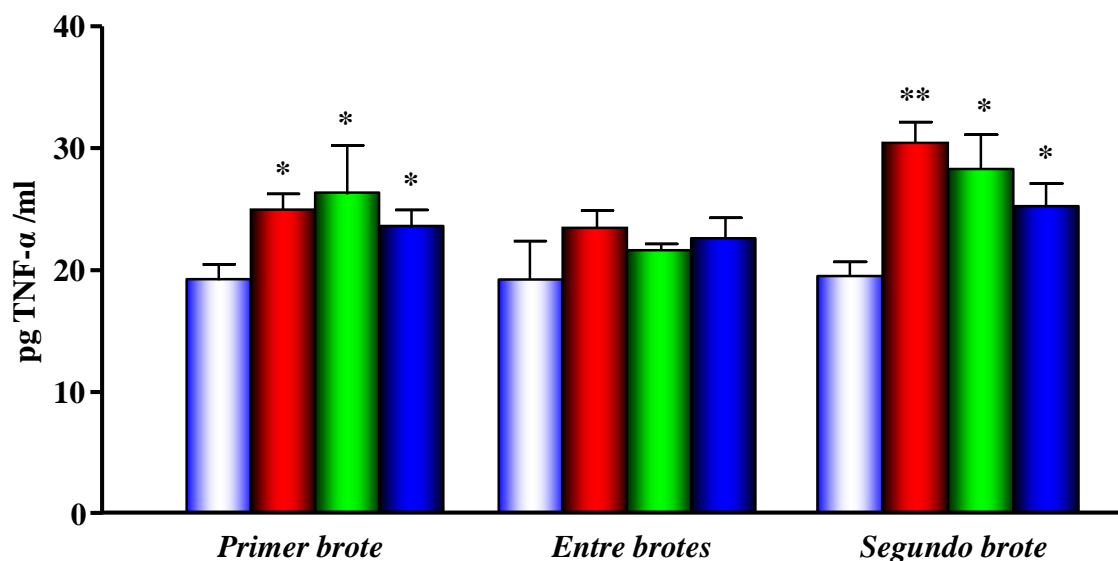


Figura 38: Niveles de TNF- α en suero de ratas control (■, n=5), ratas con EAR-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5) y ratas control+PEA (■, n=5). El estudio se realizó en las tres fases de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la concentración en picogramos de TNF- α por mililitro de suero y representan la media \pm E.S.M de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: *p<0,05.

Posteriormente, se procedió a valorar los niveles de IFN- γ en suero de rata. Los resultados muestran que en los tres periodos de la enfermedad, el suero de las ratas con EAE-CR contiene niveles elevados de dicha citoquina en comparación con las ratas control. Por otro lado, se observa que en el segundo brote de la enfermedad, las ratas con EAE-CR+PEA son las que presentan niveles elevados de IFN- γ y que las ratas control+PEA también presentan un aumento de IFN- γ (**Figura 39**).

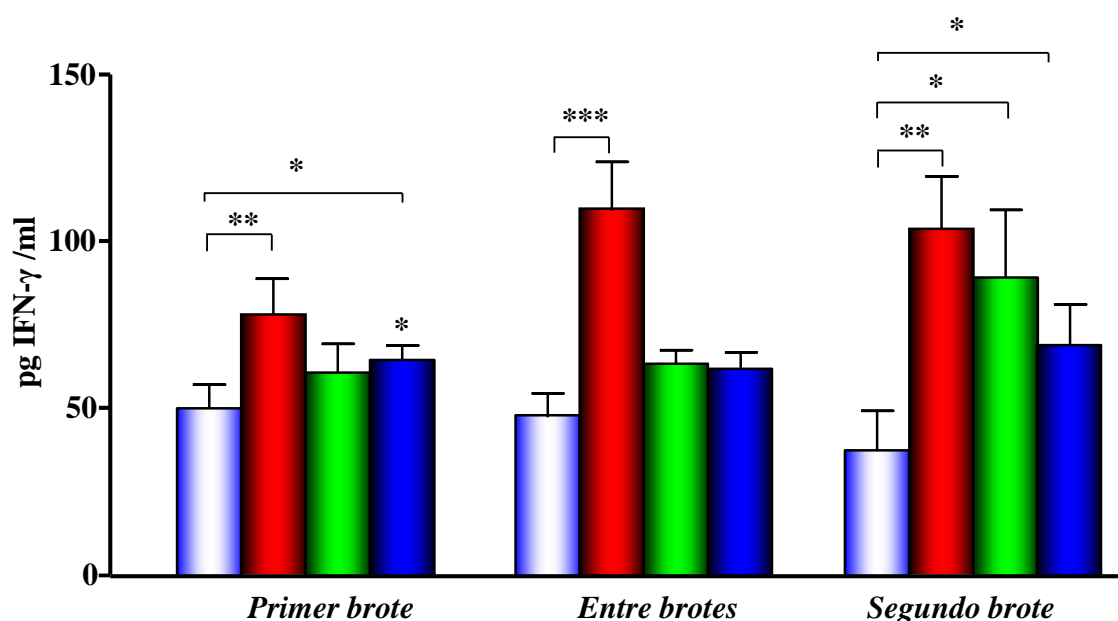


Figura 39: Niveles de IFN- γ en suero de ratas control (■, n=5), ratas con EAR-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5) y ratas control+PEA (■, n=5). El estudio se realizó en las tres fases de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la concentración en picogramos de IFN- γ por mililitro y representan la media \pm E.S.M de cinco experimentos independientes realizados cada uno por duplicado. Comparación estadística frente al control: **p<0,01.

C. ESTUDIOS HISTOLOGICO

Dada la disminución de la población de células T en sangre periférica de las ratas con EAE-CR, los signos clínicos observados y la naturaleza inflamatoria de la EAE, se realizó un análisis histológico de diferentes áreas cerebrales implicadas en procesos motores y de cognición.

C.1. CEREBELO

Entre las áreas cerebrales implicadas en el control del movimiento se realizó un estudio en el cerebelo. En primer lugar estudiamos las infiltraciones de células T (CD3⁺) (**Figura 40**). Los resultados obtenidos muestran que en el cerebelo de las ratas con EAE-CR, hay grandes infiltrados de células CD3⁺ en los tres periodos de la enfermedad, tanto de manera dispersa como en forma de placas. Los infiltrados detectados en el primer brote y en el periodo entre brotes se localizan principalmente en la sustancia blanca de los lóbulos anteriores del cerebelo: la llingula (1^{er} lóbulo), el lóbulo central (2^o lóbulo), el culmen (3^o lóbulo), también en los lóbulos medios destacando: el folium (5^o lóbulo) y el tuber (6^o lóbulo) (**Figura 40** y **Figura 41**). En los lóbulos 7^o y 8^o, también se encuentran infiltrados de células CD3⁺, aunque en menor medida que en los lóbulos

anteriores o en el 5° y 6° (**Figura 42**). En el segundo brote, el cerebelo de las ratas con EAE-CR presentan placas en el nódulo (9° lóbulo), y además de su presencia en la sustancia blanca, también se observan dentro de la capa granular del cerebelo (sustancia gris). El estudio de la subpoblación $CD3^+CD8^+$ muestra que las células $CD3^+CD8^+$ se localizan principalmente en el interior de dichas placas, tanto en el primer brote como en el segundo. En el periodo entre brotes, se observa que además de las células $CD3^+CD8^+$, existe un marcaje difuso de células $CD8^+$ (**Figura 40**).

Por otro lado, en el cerebelo de las ratas con EAE-CR+PEA, se detectó un menor número de infiltrados de células $CD3^+$ en los tres periodos de la enfermedad en comparación con las ratas con EAE-CR. La distribución de estas células es muy difusa y se centra principalmente en la sustancia blanca. De modo similar a las ratas con EAE-CR, los lóbulos anteriores y 5° y 6° del cerebro están más afectados que los lóbulos 7°, 8°, 9° y 10 (**Figura 41** y **Figura 42**). El estudio de la subpoblación de células $CD3^+CD8^+$ muestra que su número es menor en comparación con las ratas con EAE-CR en los tres periodos de la enfermedad. Además, su localización es difusa. Asimismo, en el periodo entre brotes, se observa un marcaje difuso de las células $CD8^+$.

Los resultados anteriores muestran un aumento de infiltración linfocitaria en el cerebelo de rata, por lo que el siguiente paso fue valorar el número y el grado de activación de otro tipo celular involucrado en procesos inflamatorios, las células microgliales. Para ello, se utilizó un anticuerpo de *allograph inflammatory factor* (Iba-1). Para valorar el grado de activación de células Iba-1⁺, se utilizó el sistema propuesto por (Rodrigo y col., 2010), en el cual la disminución de las ramificaciones de dichas células se correlaciona con un aumento de la actividad celular. Los resultados de las **Figura 43**, **Figura 44** y **Figura 45** muestran que las ratas con EAE-CR presentan un gran aumento del número y grado de activación de estas células en los tres periodos de la enfermedad.

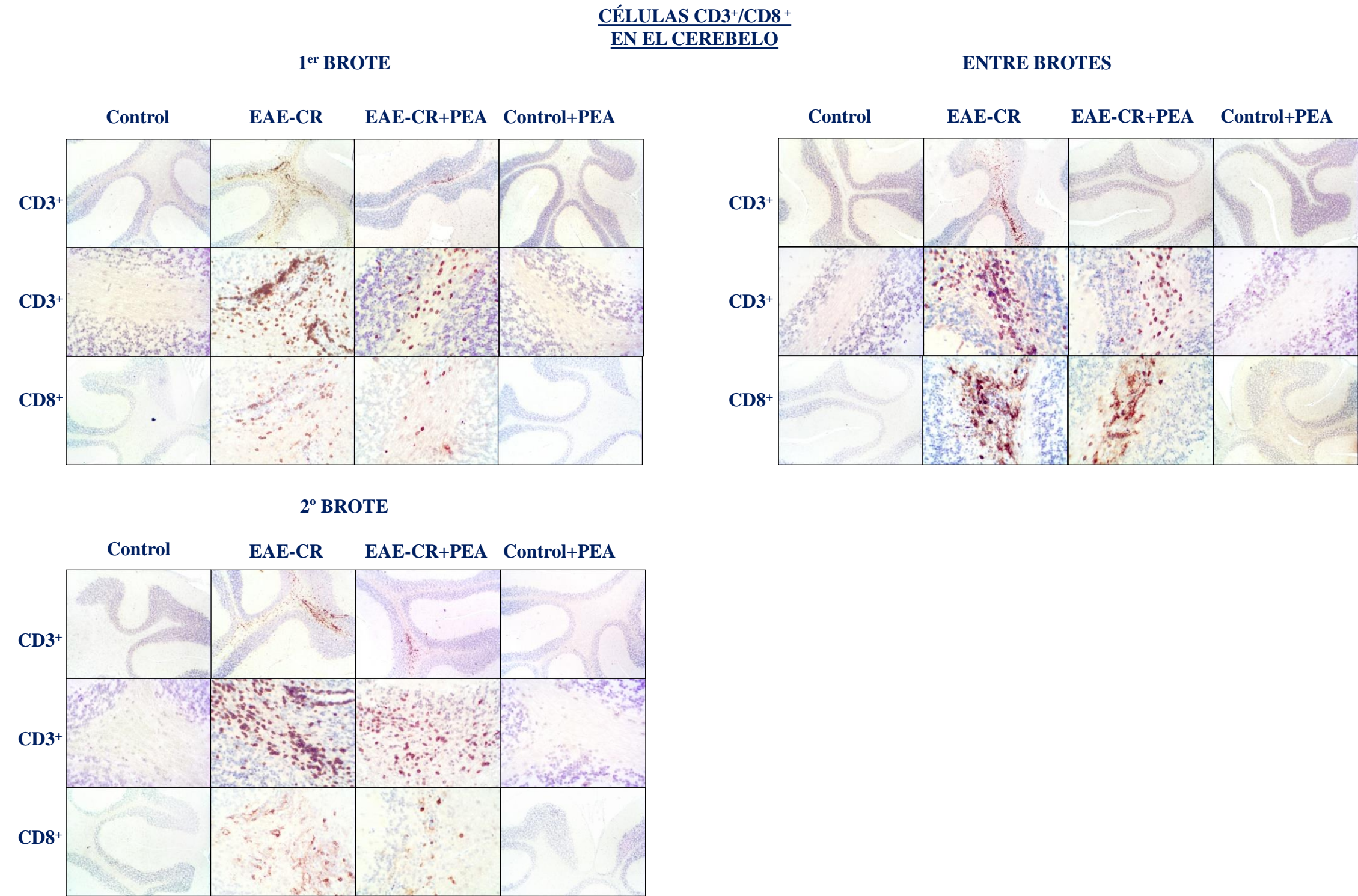


Figura 40: Estudio histológico de las células CD3⁺ y CD8⁺ en cerebelo de rata. En la figura se muestran fotografías de 40 aumentos (paneles superiores) y 200 aumentos (paneles inferiores) aumentos del cerebelo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Las imágenes son representativas de cinco experimentos independientes realizados cada uno por duplicado.

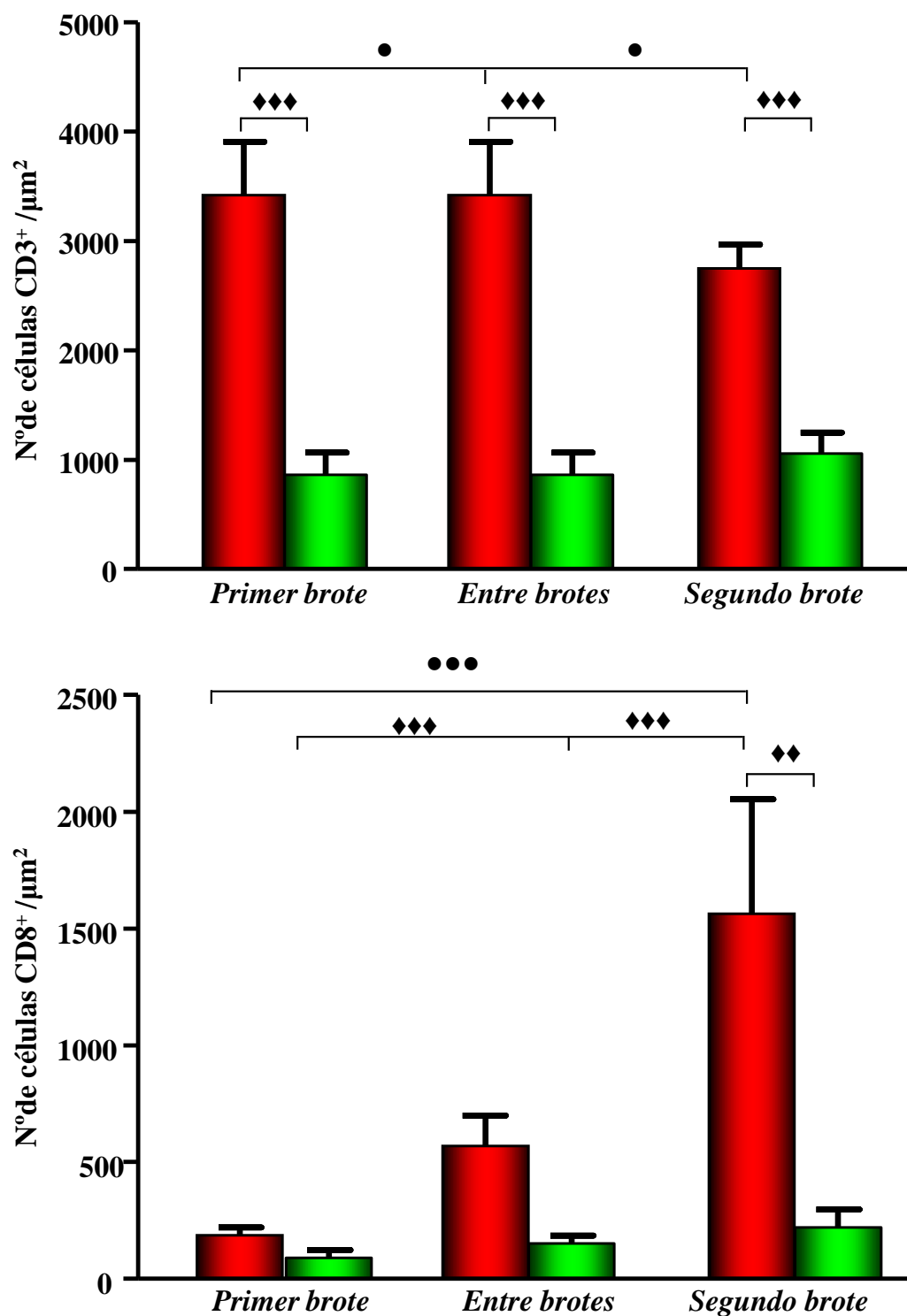


Figura 41: Histograma de células CD3⁺ y CD8⁺ infiltradas en los lóbulos anteriores y 4^o, 5^o y 6^o del cerebelo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados se muestran como número de células CD3⁺ y CD8⁺ por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del recuento de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦♦p<0,01, ♦♦p<0,001; Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●p<0,05, ●●●p<0,001.

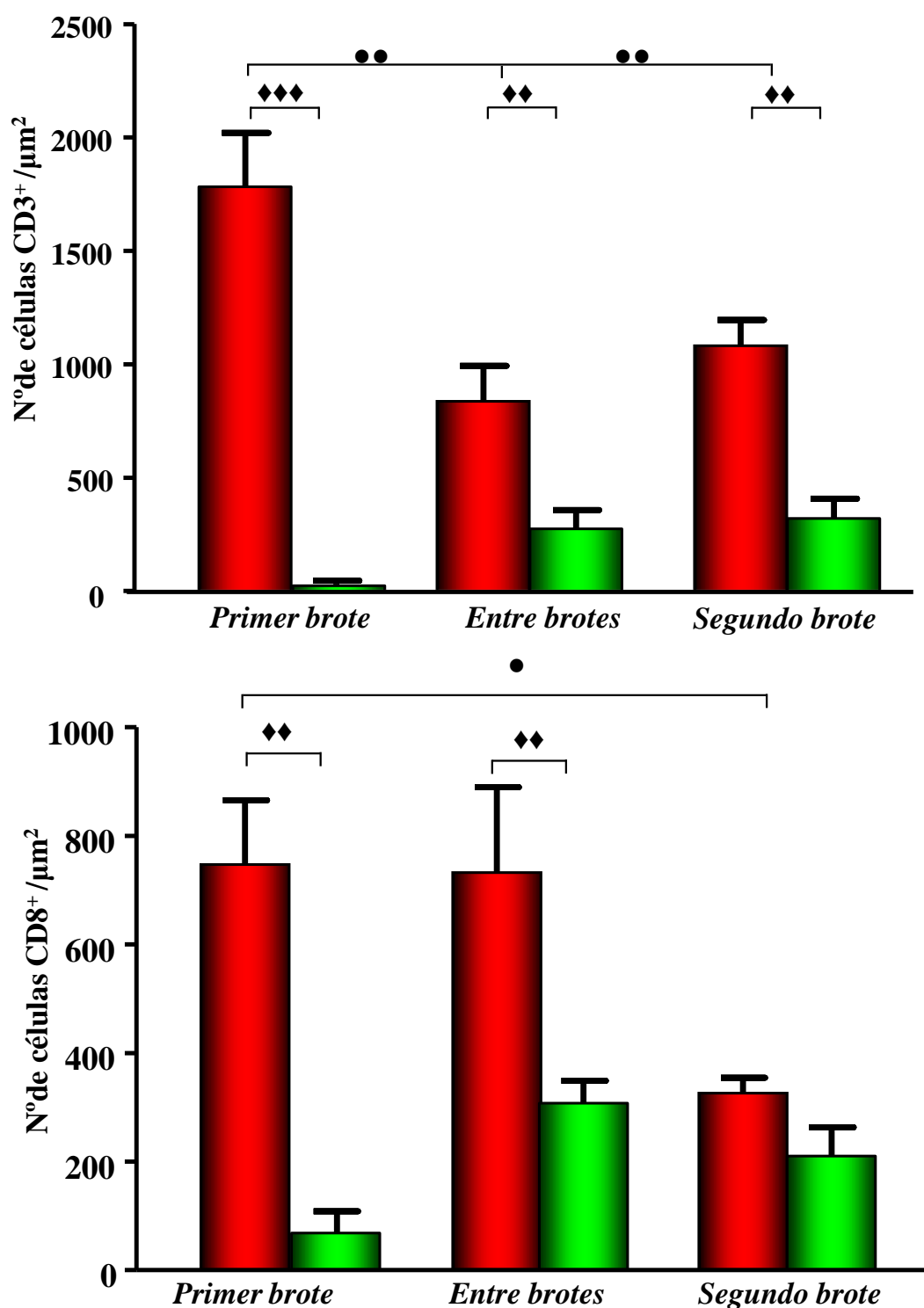


Figura 42: Histograma de células CD3⁺ y CD8⁺ infiltradas en los lóbulos 7º, 8º y 9º del cerebelo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados se muestran como número de células CD3⁺ y CD8⁺ por µm² y se representan como la media ± E.S.M del recuento de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦p<0,01, ♦♦♦p<0,001; Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: p<0,05, ●p<0,01.

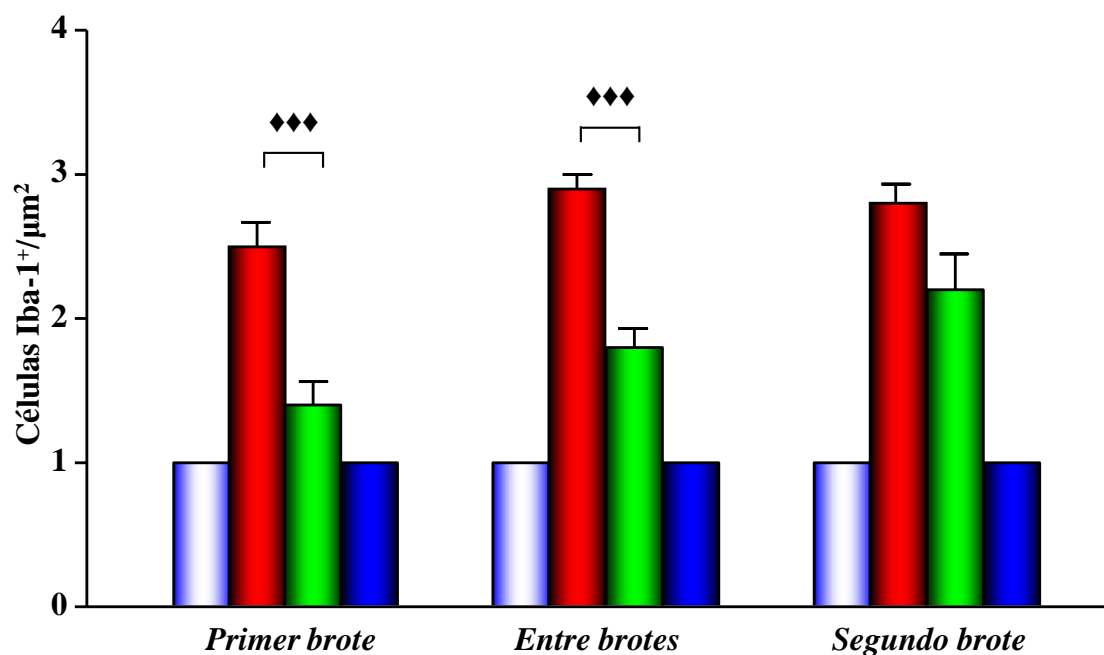


Figura 43: Histograma del número de células Iba-1⁺ infiltradas en el cerebelo de ratas control (■), ratas con EAE-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración de la densidad de células por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Escala de valoración de la intensidad de señal: nula = 0, baja = 1, moderada = 2, alta = 3). Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦♦ $p < 0,001$.

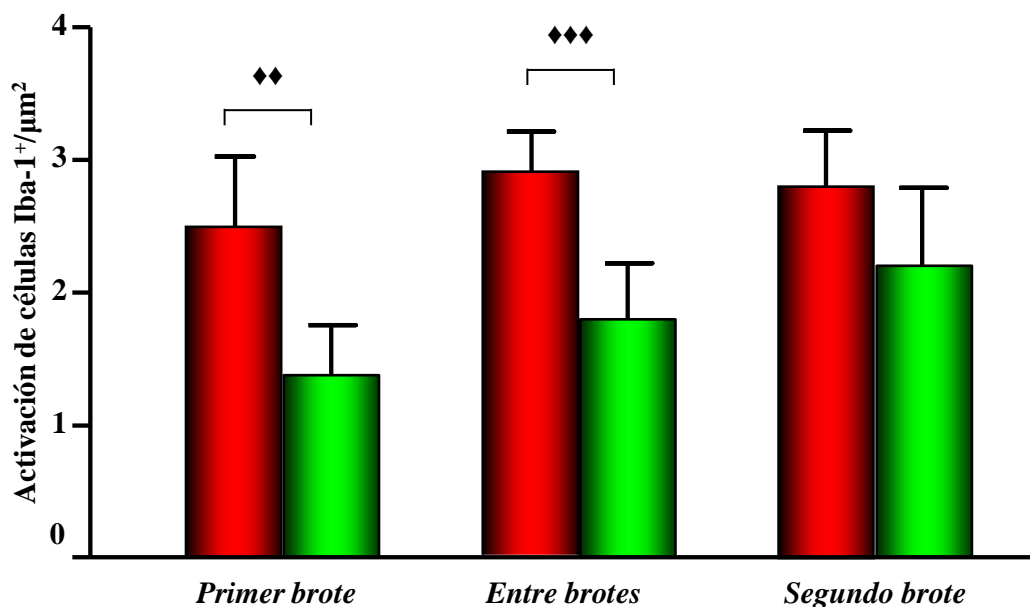
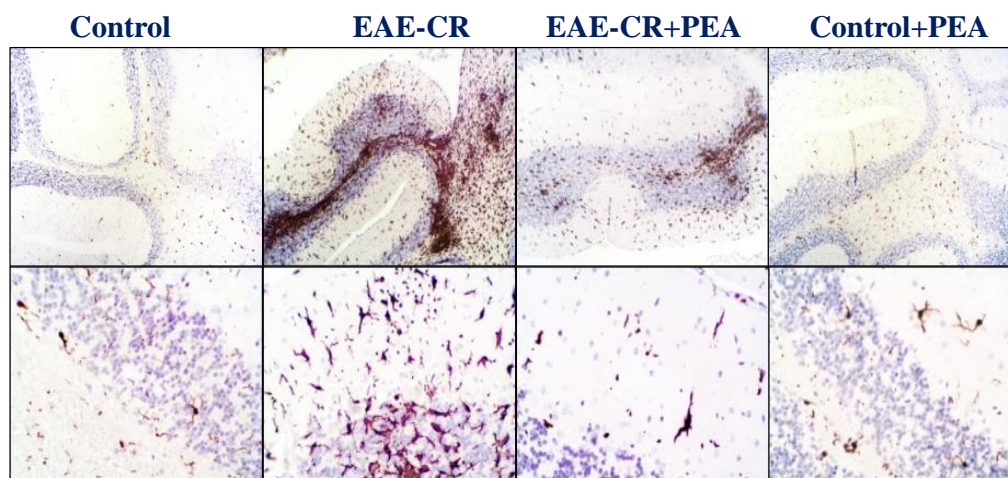


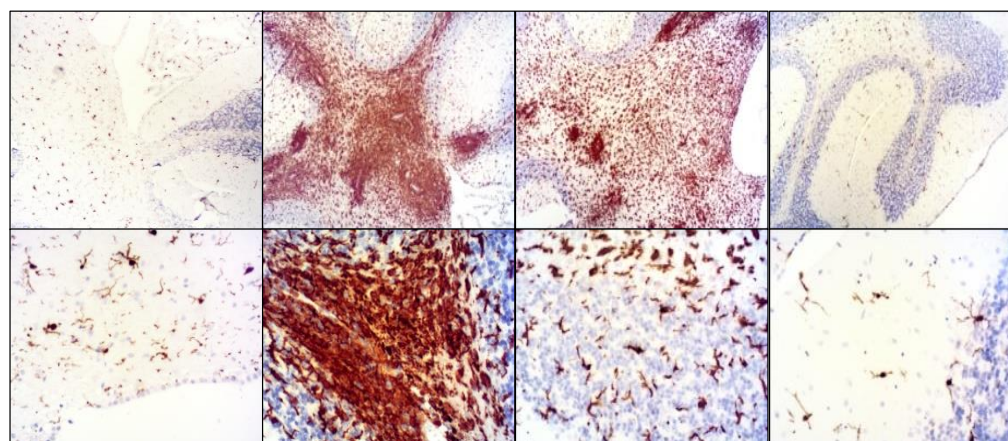
Figura 44: Histograma del grado de activación de las células Iba-1⁺ en el cerebelo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración del grado de activación por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Escala de valoración de la intensidad de la señal: nula = 0, baja = 1, moderada = 2, alta = 3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦ $p < 0,01$, ♦♦♦ $p < 0,001$.

CÉLULAS Iba-1⁺ EN EL CEREBELO

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

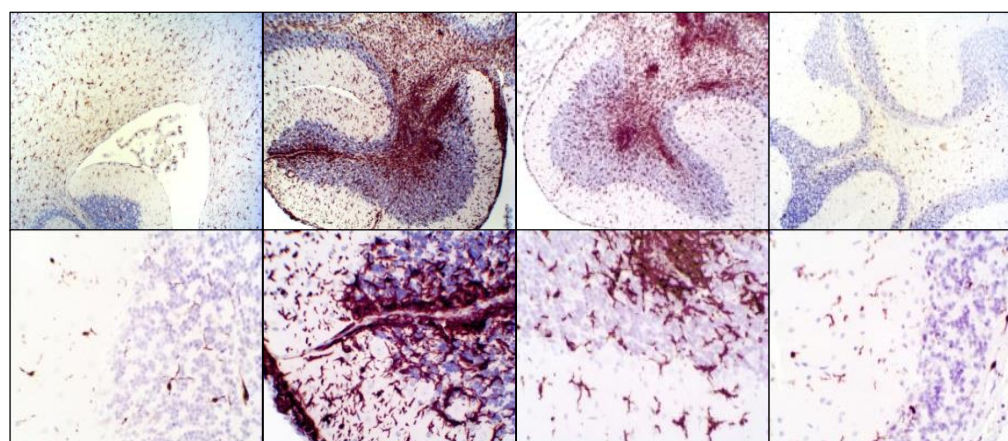


Figura 45: Estudio de las células Iba-1⁺ en el cerebelo de rata. En la figura se muestran las fotografías con 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) del cerebelo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco animales independientes.

En las ratas con EAE-CR, las células Iba-1⁺ están distribuidas por todo el cerebelo, no solo en la sustancia blanca, sino también en la capa granular y en la corteza del cerebelo (**Figura 45**). Por otro lado, en el cerebelo de las ratas con EAE-CR+PEA, hay un menor número de células Iba-1⁺ en comparación con las ratas con EAE-CR (**Figura 43**). Además, dichas células se localizan principalmente en placas (**Figura 45**), aunque el grado de activación es similar al de las ratas con EAE-CR (**Figura 44**).

A continuación, se valoró si existían infiltrados de linfocitos B en el cerebelo que pudieran contribuir a las alteraciones encontradas en esta área cerebral. Para ello, se valoró la presencia de IgG en tejido. Las imágenes de la **Figura 46** muestran que en el cerebelo de las ratas con EAE-CR, hay un aumento en los niveles de IgG en comparación con las ratas control y las ratas con EAE-CR+PEA. Además, en las ratas con EAE-CR, se observa que los niveles de esta inmunoglobulina son mayores en el primer brote en comparación con el periodo entre brotes o el segundo brote (**Figura 47**). En el cerebelo de las ratas con EAE-CR+PEA, también se observa un aumento de los niveles de IgG en el primer y segundo brote de la enfermedad, aunque mucho menor que en el cerebelo de las ratas con EAE-CR. Asimismo, en estas ratas pretratadas con PEA, se observa una mayor señal en las zonas del cerebelo cercanas al cuarto ventrículo (**Figura 46**).

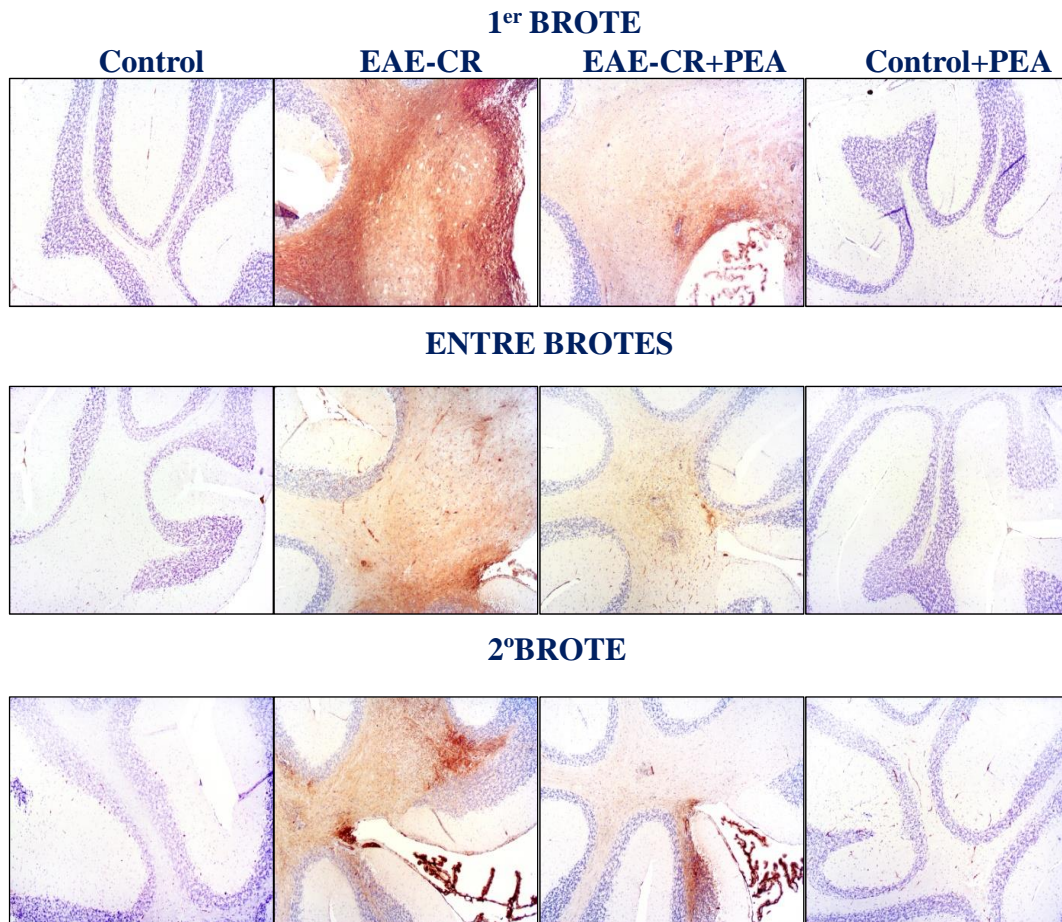
INMUNOGLOBULINA G EN EL CEREBELO

Figura 46: Estudio de la IgG en el cerebelo de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 40 aumentos de los niveles de IgG detectados por inmunohistoquímica en el cerebelo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco animales por grupo.

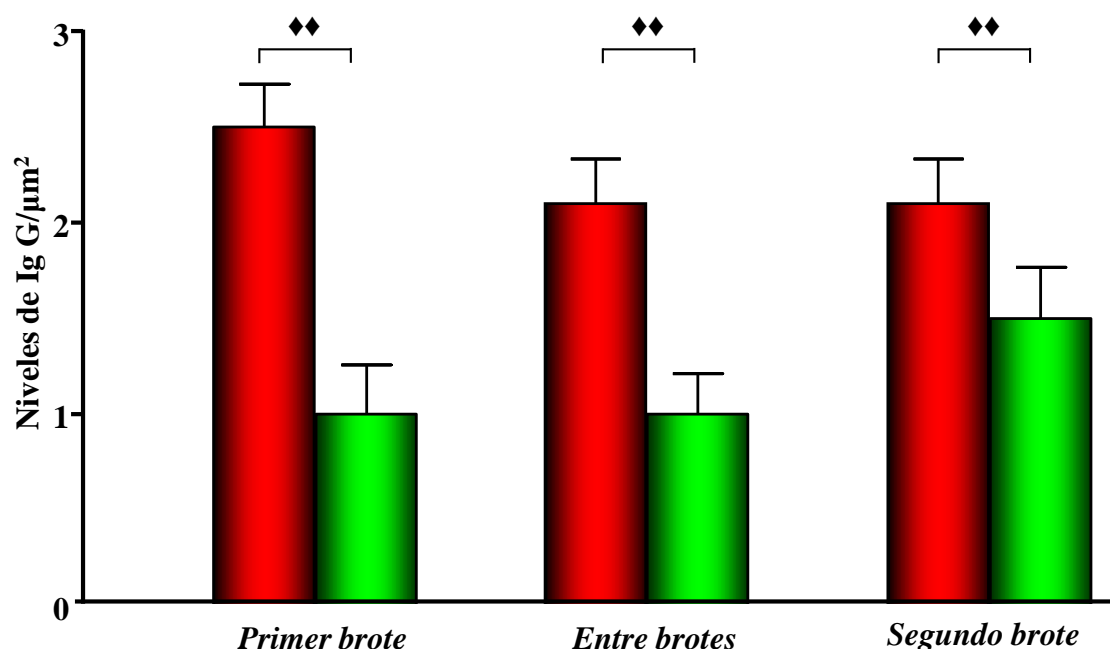
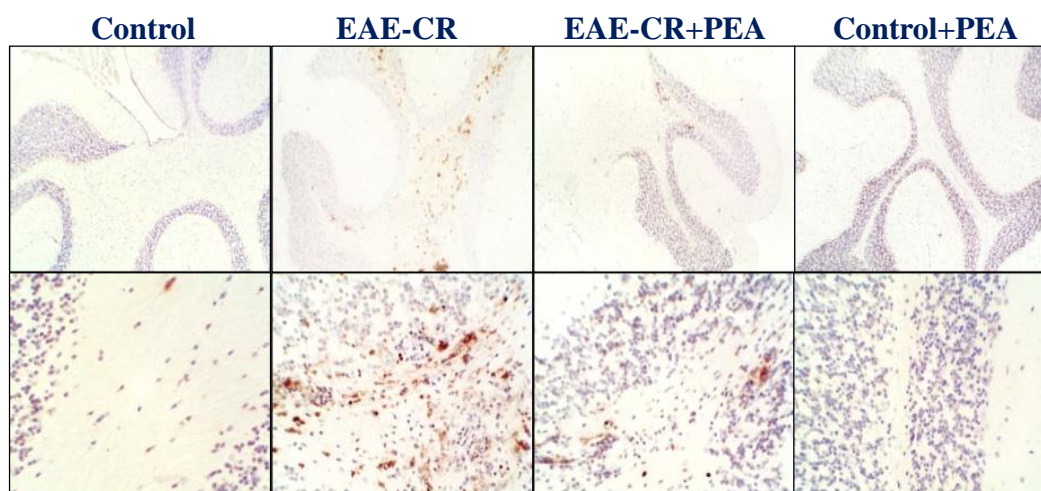


Figura 47: Histograma de los niveles de IgG en el cerebelo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración de los niveles de IgG por μm^2 y se representa como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados cada uno por duplicado. Escala de valoración de la intensidad de la señal: nula= 0, baja= 1, moderada= 2, alta= 3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦ $p<0,01$.

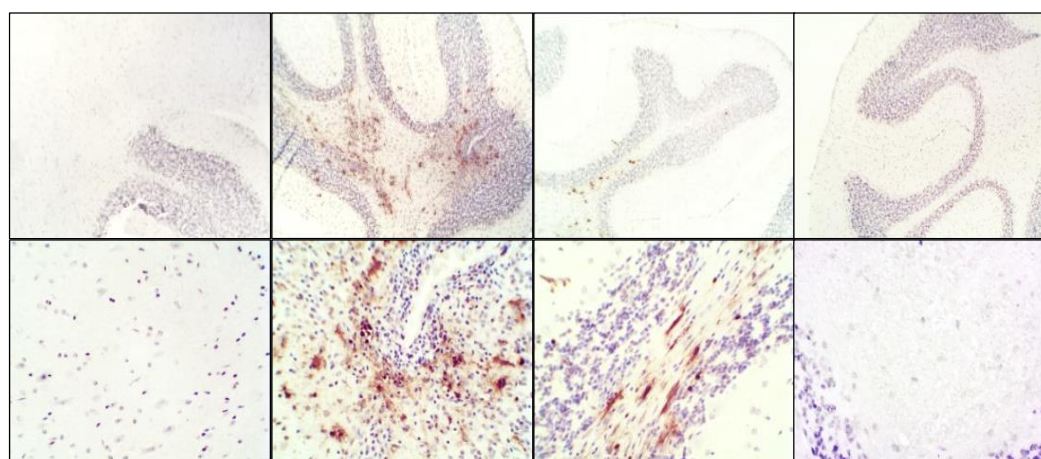
A la vista de los resultados anteriores, nos propusimos evaluar los niveles de células apoptóticas mediante una tinción *in situ* de núcleos apoptóticos. Los resultados de la **Figura 48** muestran que en el cerebelo de las ratas con EAE-CR, hay un aumento de los niveles de células TUNEL(+) en comparación con las ratas control y las ratas con EAE-CR+PEA. Las células TUNEL(+) se localizan principalmente en la sustancia blanca de los lóbulos anteriores, 4º, 5º y 6º, tanto en el primer brote como en el periodo entre brotes. Sin embargo, en el segundo brote de la enfermedad, se observa también la presencia de células TUNEL(+) en los lóbulos 7º, 8º 9º y 10º, no solo en la sustancia blanca del cerebelo, sino también en la capa granular. En las ratas con EAE-CR+PEA se observa un menor número de células TUNEL(+) en comparación con las ratas EAE-CR en las ramas anteriores, en los tres periodos de la enfermedad (**Figura 49**).

CÉLULAS TUNEL (+) EN EL CEREBELO

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

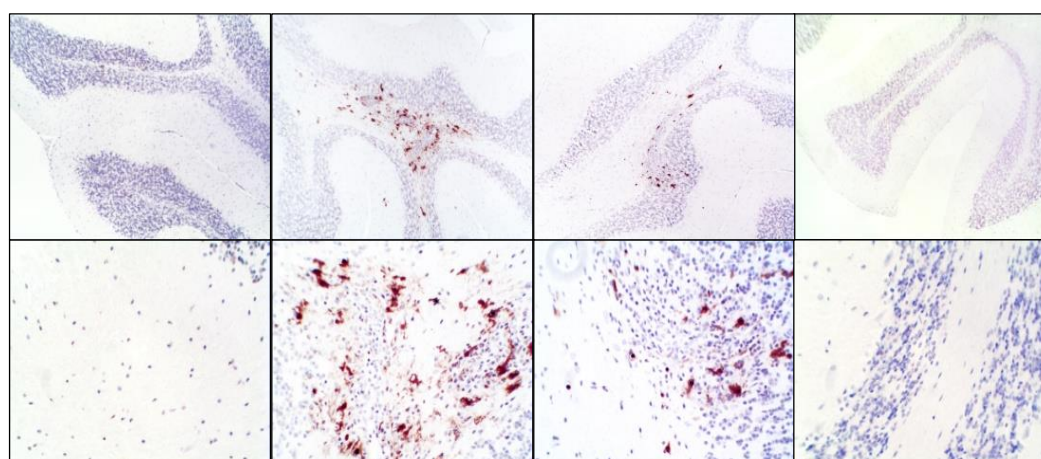
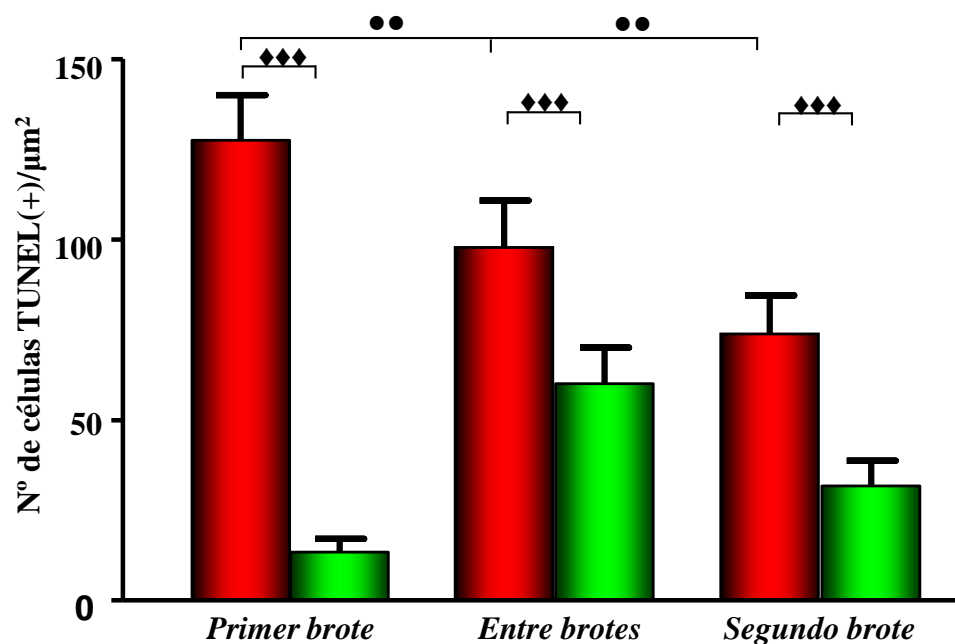


Figura 48: Tinción de TUNEL en el cerebelo de rata. En la figura, se muestran las fotografías 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) del cerebelo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco tinciones independientes.

Lóbulos anteriores, 4º, 5º y 6º del cerebelo



Lóbulos 7º, 8º, 9º y 10º del cerebelo

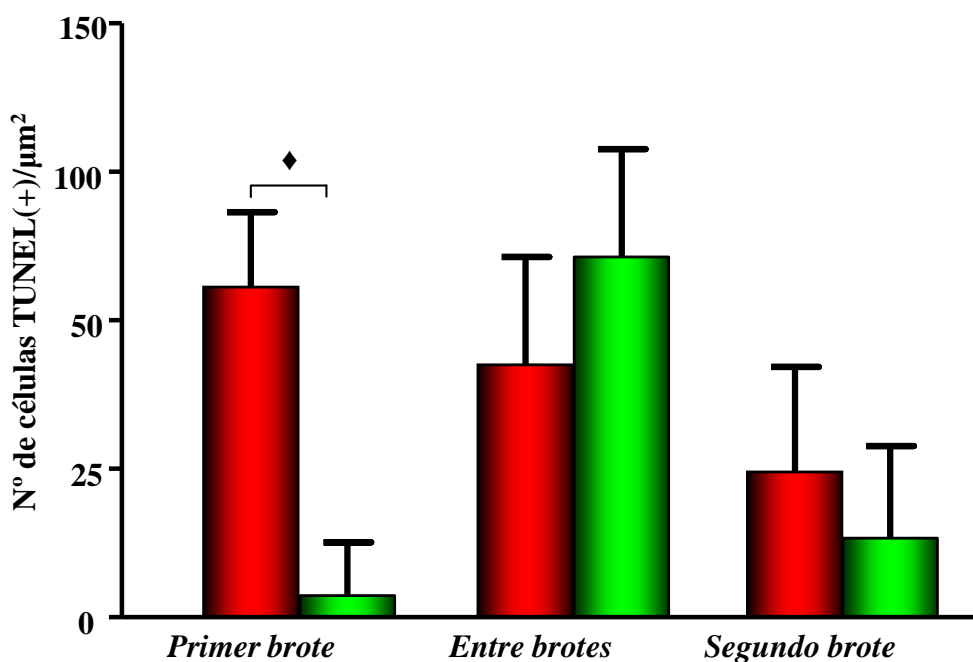


Figura 49: Histograma de células TUNEL+ en todos los lóbulos del cerebelo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados muestran el número de células TUNEL(+) por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del recuento de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦ $p < 0,05$, ♦♦♦ $p < 0,001$; Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●● $p < 0,01$.

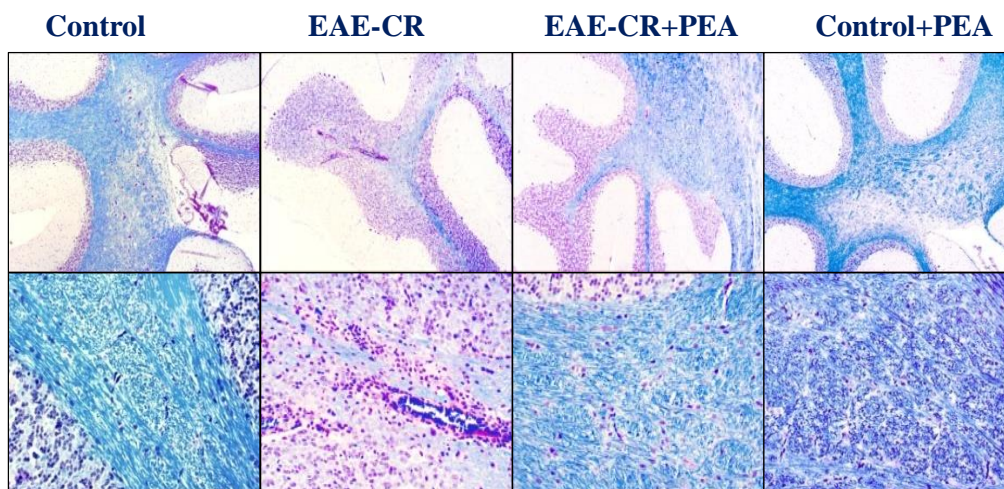
A continuación, estudiamos el grado de desmielinización de las ramas aferentes y eferentes del cerebelo. Dicho parámetro se valoró con una tinción *Fast Blue/PAS*. Los resultados de la **Figura 50** muestran grandes placas desmielinizantes en los lóbulos anteriores, principalmente en la língula, el folium y el tuber en las ratas con EAE-CR en los tres periodos de la enfermedad, siendo dichas placas de mayor tamaño en el segundo brote. En las ratas con EAE-CR+PEA, solo se observan placas desmielinizantes en el segundo brote, y éstas son de pequeño tamaño en comparación con las placas observadas en ratas con EAE-CR.

C.2. CUERPOS MAMILARES

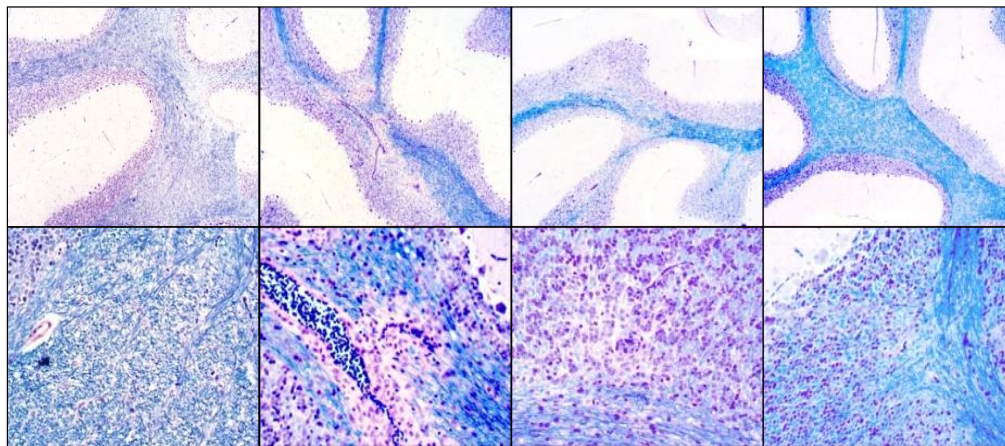
Además de las alteraciones motoras, se ha descrito que el 50% de los pacientes con EM presentan déficits cognitivos. Por ello, en el presente trabajo se estudió áreas cerebrales implicadas en los procesos de almacenamiento de información como son los cuerpos mamilares y el hipocampo. Estas dos áreas cerebrales, junto con el tálamo y la amígdala, forman el sistema límbico. Las conexiones nerviosas que se establecen entre estas áreas cerebrales fueron descritas por primera vez por Christofredo Jacob (1908) y posteriormente por James Papez (1937). Actualmente, se conocen como cerebro visceral o circuito de Papez, el cual está implicado en la memoria y en el control de las emociones. Entre las áreas cerebrales que lo constituyen, decidimos estudiar los cuerpos mamilares y el hipocampo.

TINCIÓN FAST BLUE/PAS CEREBELO

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

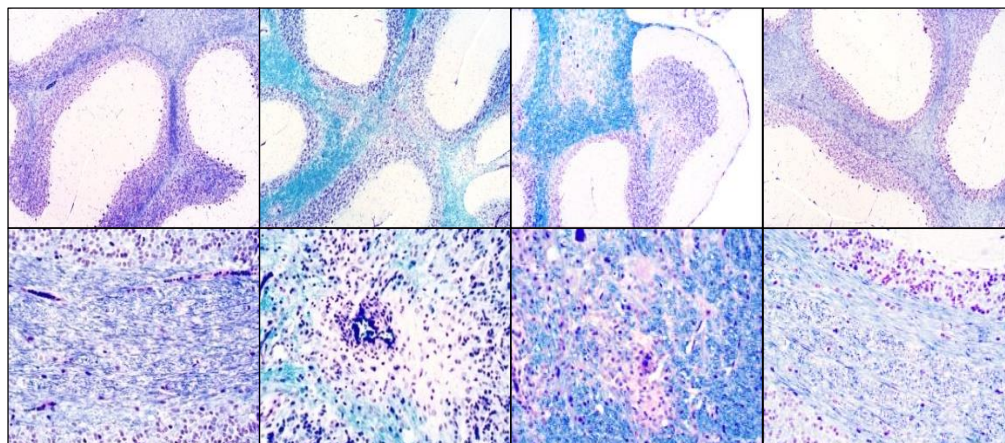


Figura 50: Tinción Fast Blue/PAS de cerebelo de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 40 aumentos (paneles superiores) y 200 aumentos (paneles inferiores) de cerebelo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco animales por grupo.

Para el estudio histológico de los cuerpos mamilares se valoraron, en primer lugar, los niveles de infiltrados de células T. Los resultados (**Figura 51**) muestran que en estas áreas cerebrales de las ratas con EAE-CR, existen infiltrados de células T ($CD3^+$) en los tres periodos de la enfermedad, siendo más abundantes en el primer brote y en el periodo entre brotes. Estos infiltrados se disponen tanto en forma de células dispersas como en forma de placas (**Figura 51**). El estudio de la subpoblación $CD3^+CD8^+$ muestra que dichas células se localizan principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y en el interior de las placas, tanto en el primer brote como en el periodo entre brotes. Por otro lado, las ratas con EAE-CR+PEA presentan menos infiltrados de células $CD3^+$ en los cuerpos mamilares en comparación con las ratas con EAE-CR. Asimismo, su distribución es más dispersa (**Figura 51**), y el número de células $CD3^+CD8^+$ también es menor en comparación con las ratas con EAE-CR (**Figura 52**).

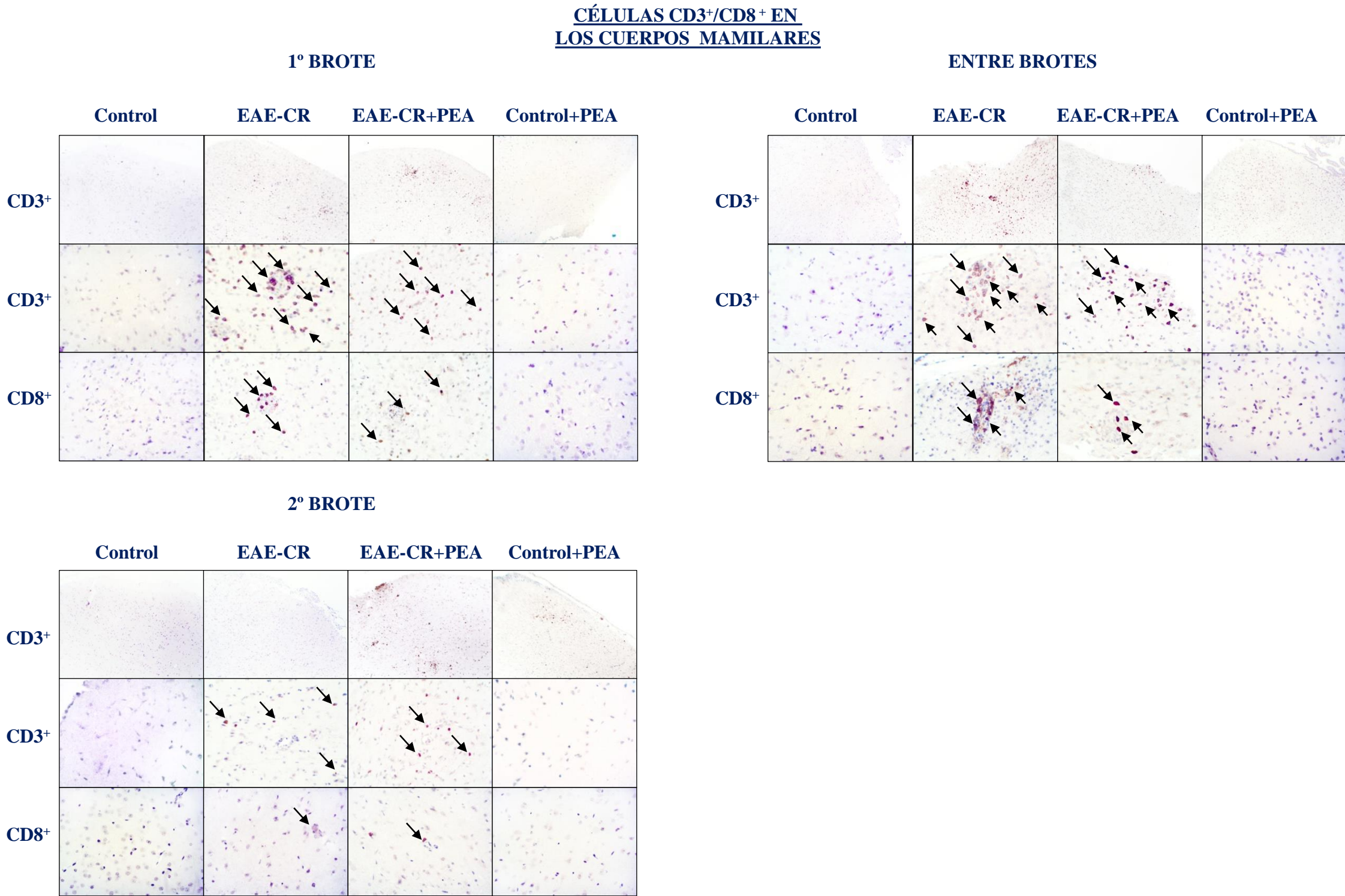


Figura 51: Estudio histológico de las células CD3⁺ y CD8⁺ en los cuerpos mamilares de rata. En la figura se muestran fotografías de 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) de los cuerpos mamilares de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Las imágenes son representativas de cinco experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por duplicado.

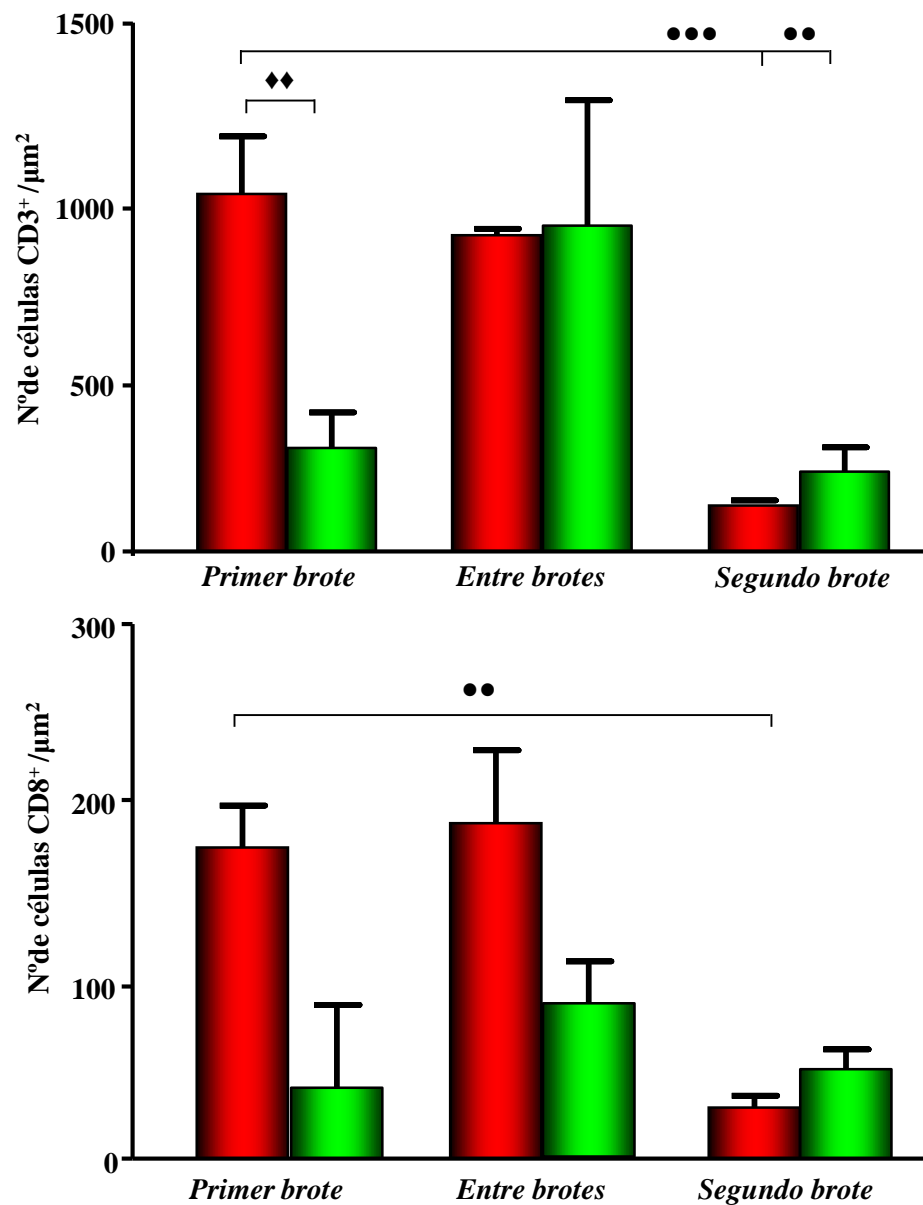


Figura 52: Histograma de células CD3⁺ y CD8⁺ infiltradas en los cuerpos mamilares de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados se muestran como número de células CD3⁺ y CD8⁺ por µm² y representan la media ± E.S.M del recuento de 10 campos por muestra de cinco experimentos independientes, realizados cada uno por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦p<0,01. Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●●p<0,01, ●●●p<0,001.

A continuación procedimos a evaluar el número y el grado de activación de las células Iba⁺ en estas áreas cerebrales. Los resultados muestran que en las ratas con EAE-CR, hay un aumento del número y grado de activación de las células Iba-1⁺ en comparación con las ratas control en los tres periodos de la enfermedad, siendo mayor en el primer brote (**Figura 53** y **Figura 55**). Además, las células Iba-1⁺ se concentran en grandes placas celulares y alrededor de los vasos sanguíneos, como se puede observar en la **Figura 54**. En las ratas con EAE-CR+PEA, también se detecta un aumento en el número de células Iba-1⁺ en los tres periodos de la enfermedad en comparación con las ratas control, aunque es menor en comparación con las ratas con EAE-CR (**Figura 53** y **Figura 55**). Asimismo, la distribución de las células Iba-1⁺ en estas ratas es difusa.

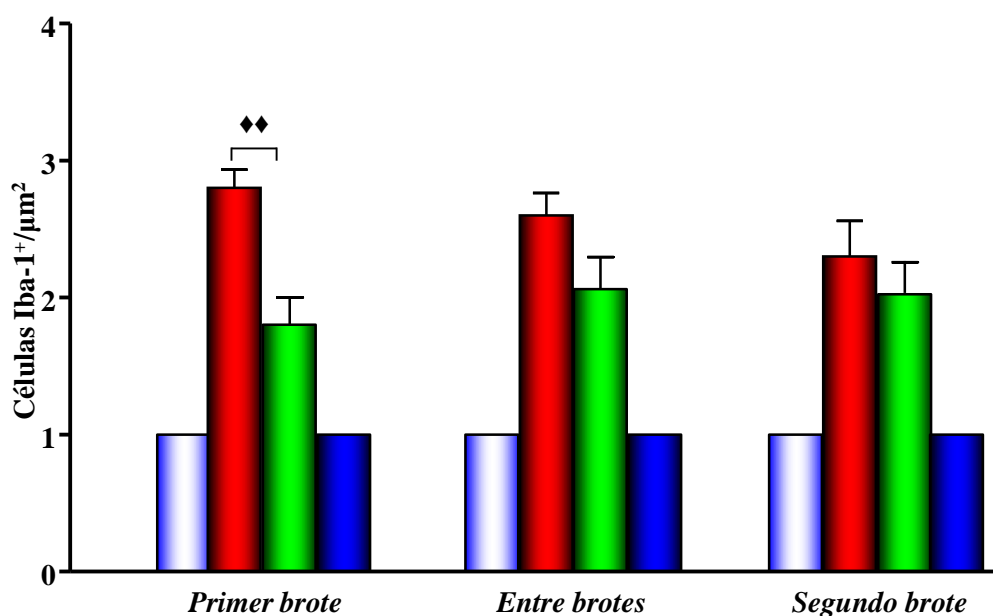


Figura 53: Histograma representativo del número de células Iba-1⁺ infiltradas en los cuerpos mamilares de ratas control (■), ratas con EAE-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración de la densidad de células por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Escala de valoración del grado de intensidad de la señal: nula= 0, baja= 1, moderada= 2, alta= 3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦p<0,01.

CÉLULAS Iba-1⁺ EN LOS CUERPOS MAMILARES

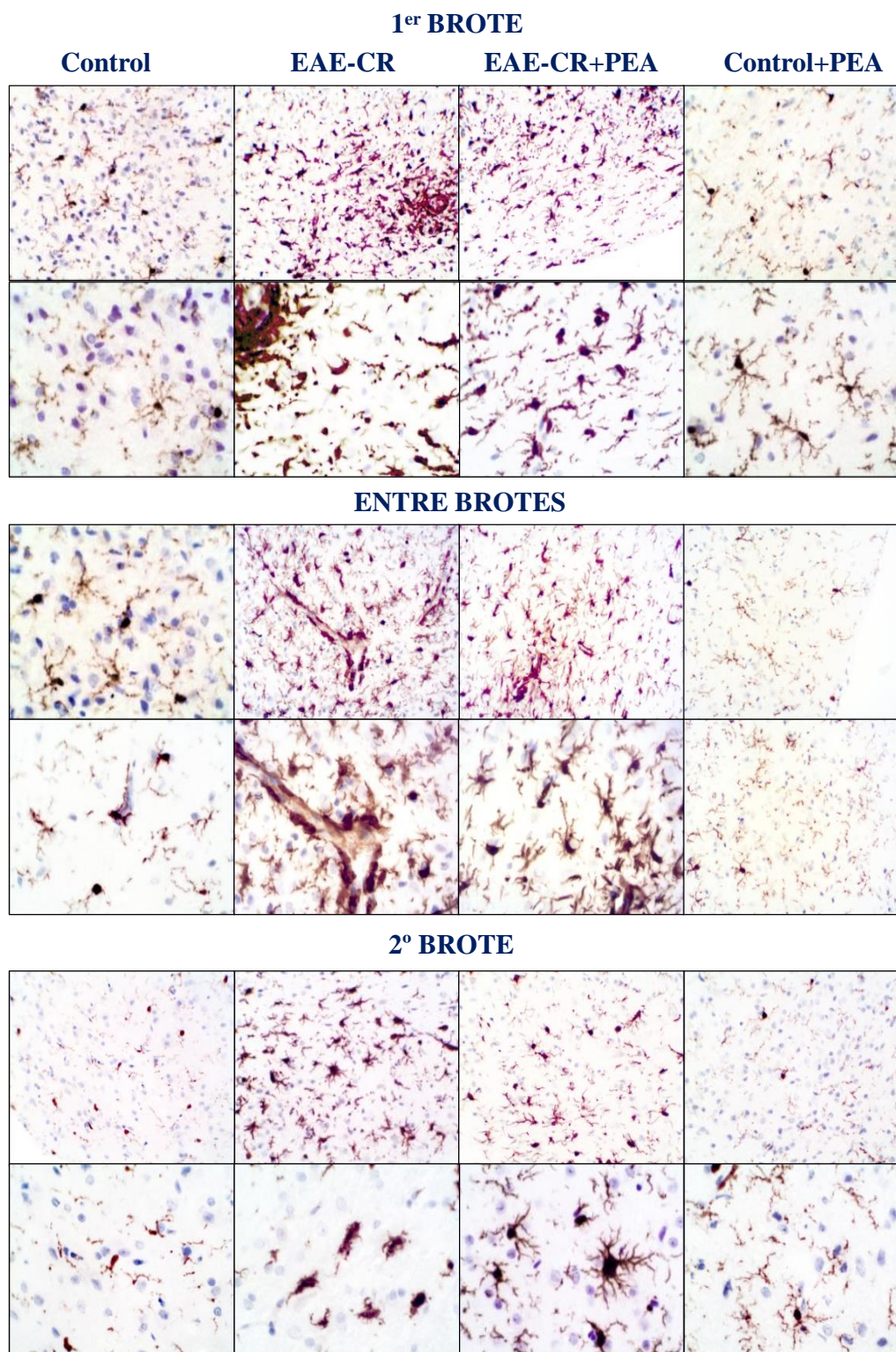


Figura 54: Estudio de las células Iba-1⁺ en los cuerpos mamilares de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) de los cuerpos mamilares de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco animales independientes.

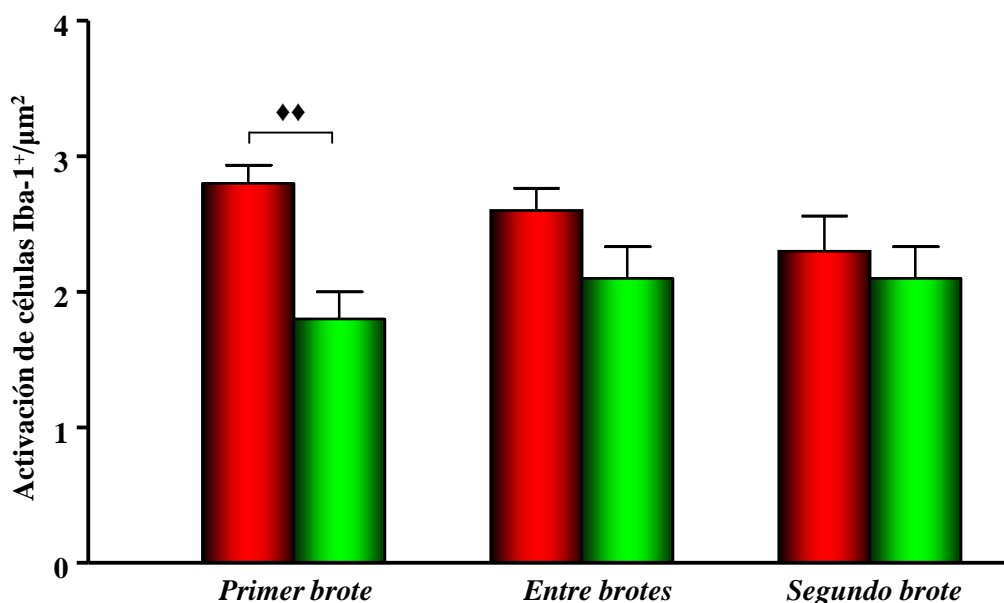
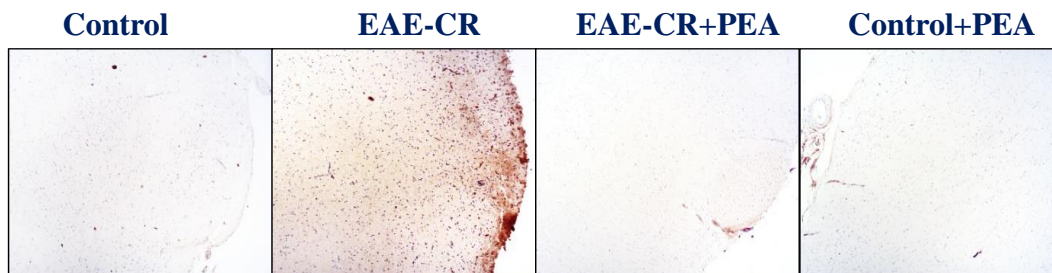


Figura 55: Histograma representativo del grado de activación de las células Iba-1⁺ en los cuerpos mamilares de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración del grado de activación por μm^2 y se representa como la media \pm E.S.M del estudio de 5-10 campos por muestra de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Escala de valoración de la intensidad de la señal: nula= 0, baja= 1, moderada= 2, alta= 3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦ $p<0,01$.

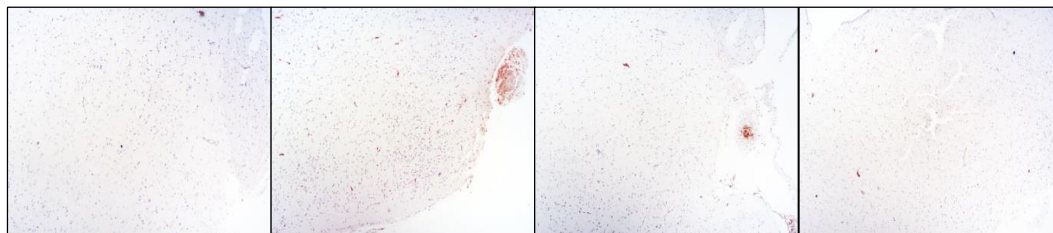
El siguiente paso fue valorar la existencia de células B en los cuerpos mamilares. Para ello, se analizaron los niveles de IgG. Los resultados de la **Figura 56** y de la **Figura 57** muestran que en las ratas con EAE-CR, hay un aumento en los niveles de esta inmunoglobulina en los cuerpos mamilares en comparación con las ratas control, especialmente en el segundo brote. Por otro lado, en las ratas con EAE-CR+PEA, se detectan niveles menores de IgG en comparación con las ratas con EAE-CR (**Figura 56** y **Figura 57**).

INMUNOGLOBULINA G EN LOS CUERPOS MAMILARES

1^{er} BROTE



ENTRE BROTE



2^oBROTE

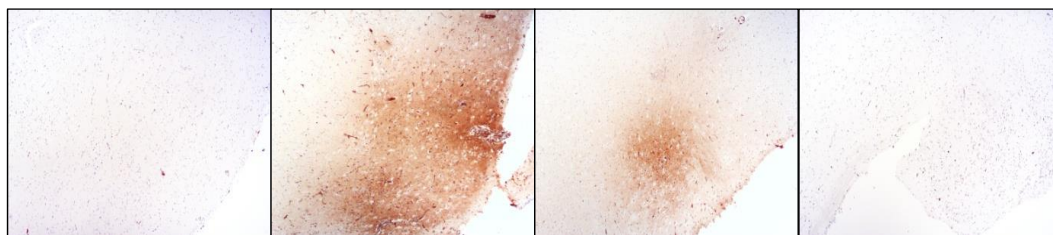


Figura 56: Estudio de la inmunoglobulina G en los cuerpos mamilares de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 40 aumentos de los niveles de IgG detectados por inmunohistoquímica en los cuerpos mamilares de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

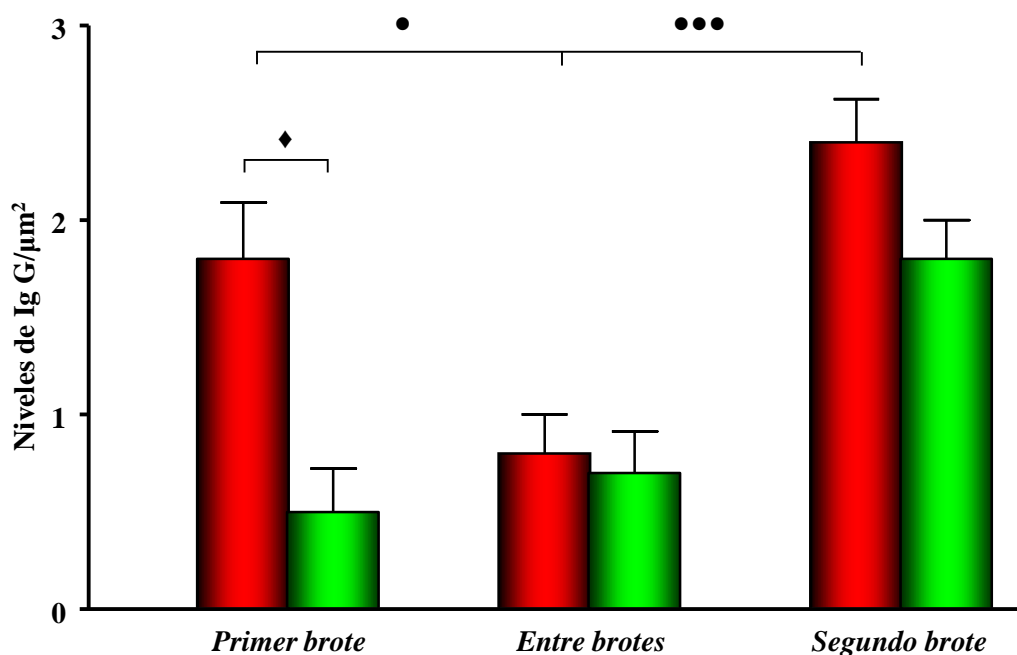
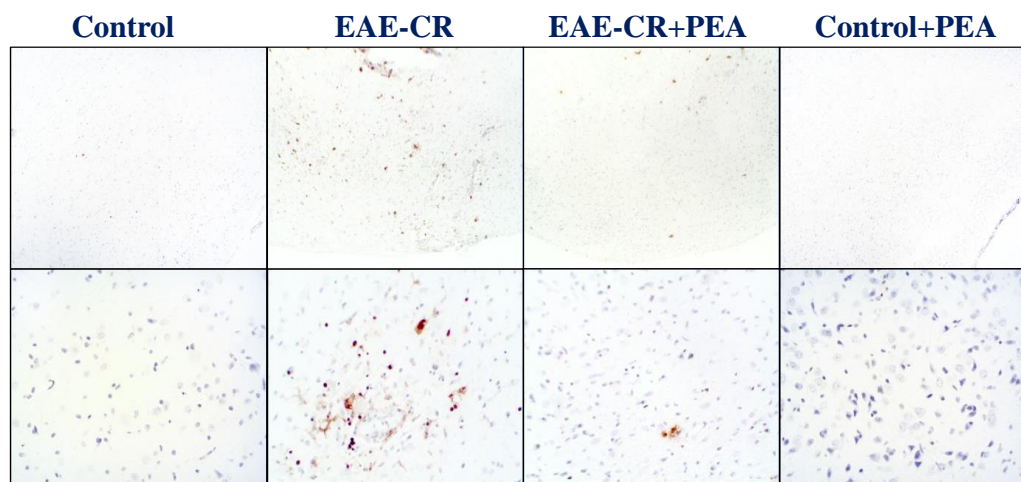


Figura 57: Histograma representativo de los niveles de inmunoglobulina G en los cuerpos mamilares de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración del nivel de IgG por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Escala de valoración de la intensidad de la señal: nula= 0, baja= 1, moderada= 2, alta= 3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦ $p < 0,05$. Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ● $p < 0,05$, ●●● $p < 0,001$.

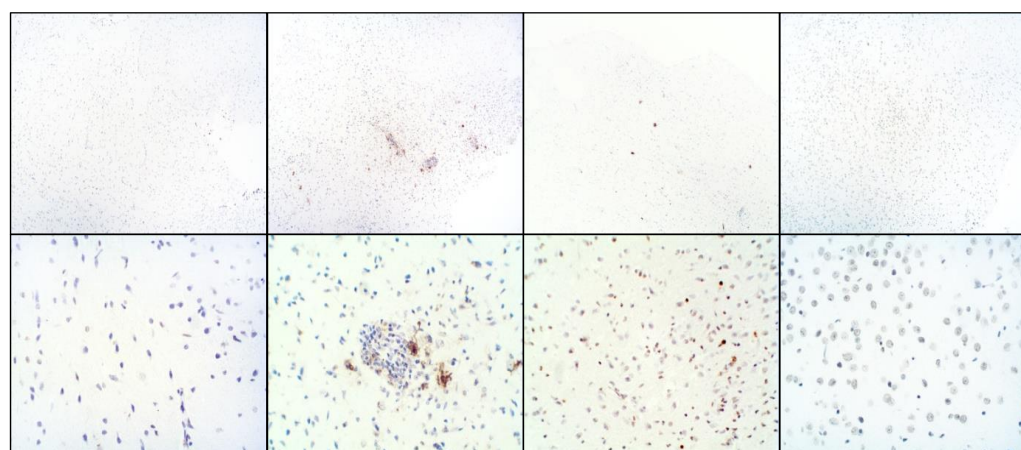
Por otro lado, valoramos si había muerte por apoptosis en esta área cerebral, para lo que se realizó una tinción TUNEL. Los resultados de la **Figura 58** muestran que en las ratas con EAE-CR, hay un aumento de las células TUNEL(+) en los cuerpos mamilares en los tres periodos de la enfermedad en comparación con las ratas control y ratas con EAE-CR+PEA (**Figura 59**).

CÉLULAS TUNEL (+) EN LOS CUERPOS MAMILARES

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

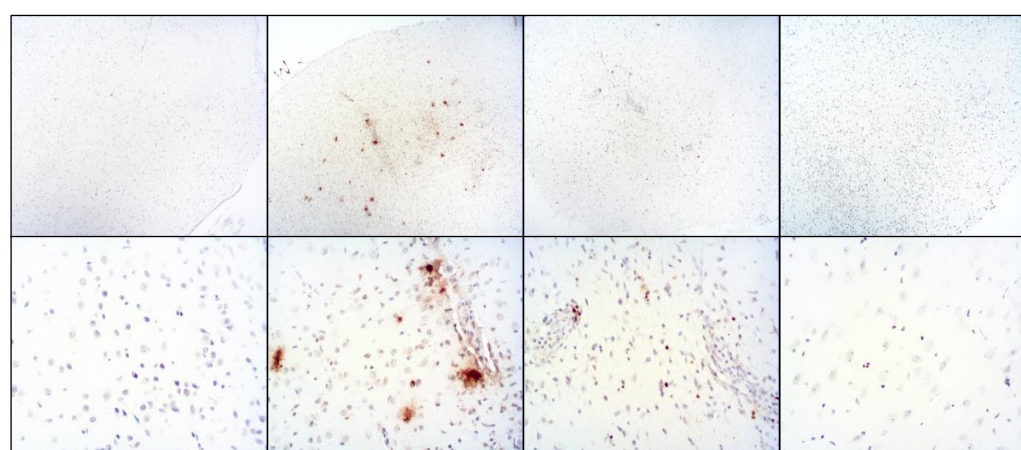


Figura 58: Tinción de TUNEL en los cuerpos mamilares de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) de los cuerpos mamilares de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco tinciones independientes.

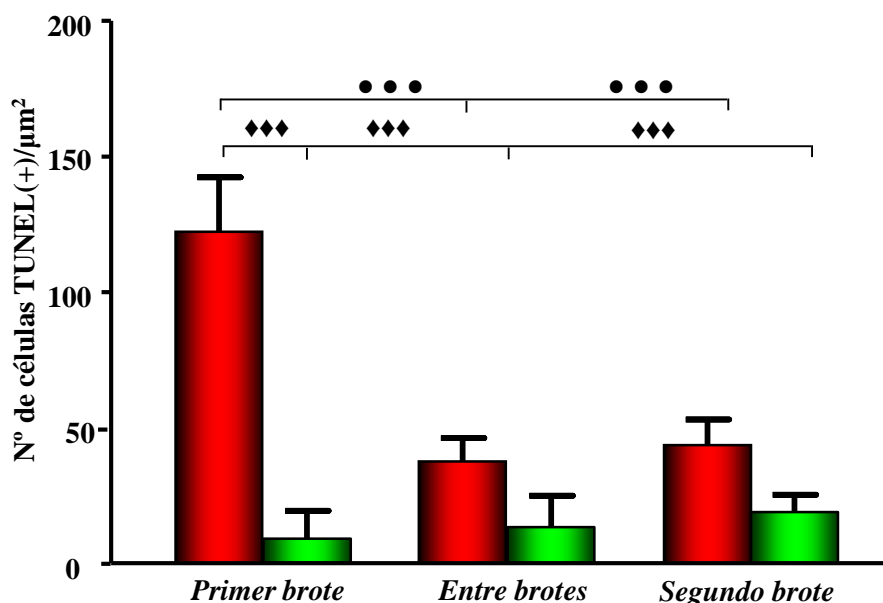


Figura 59: Histograma de células TUNEL(+) en los cuerpos mamilares de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados muestran el número de células TUNEL(+) por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del recuento de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦♦ $p < 0,001$; Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●●● $p < 0,001$.

C.3. HIPOCAMPO

Entre las áreas cerebrales que integran el circuito de Papez, el hipocampo es el centro del sistema ya que recibe y emite fibras (aferentes y eferentes) de áreas sensitivas, de asociación (visual, aditiva y somatosensitiva). Los estímulos llegan al giro dentado a través de las fibras prefrontales y las proyecta sobre las capa CA3 del hipocampo, que a su vez las proyecta sobre las CA1. Esta última área remite los estímulos al subículum que los retorna a las áreas asociadas y a los cuerpos mamilares a través del fornix. Dada su importancia en la integración de la información realizamos un estudio detallado de las alteraciones hipocampales en la EAE-CR así como el posible efecto terapéutico de la sal del PEA en las mismas. Para ello, se analizó, en primer lugar, la existencia de infiltrados de células T (CD3^+).

**CÉLULAS CD3⁺/CD8⁺ EN EL
HIPOCAMPO**

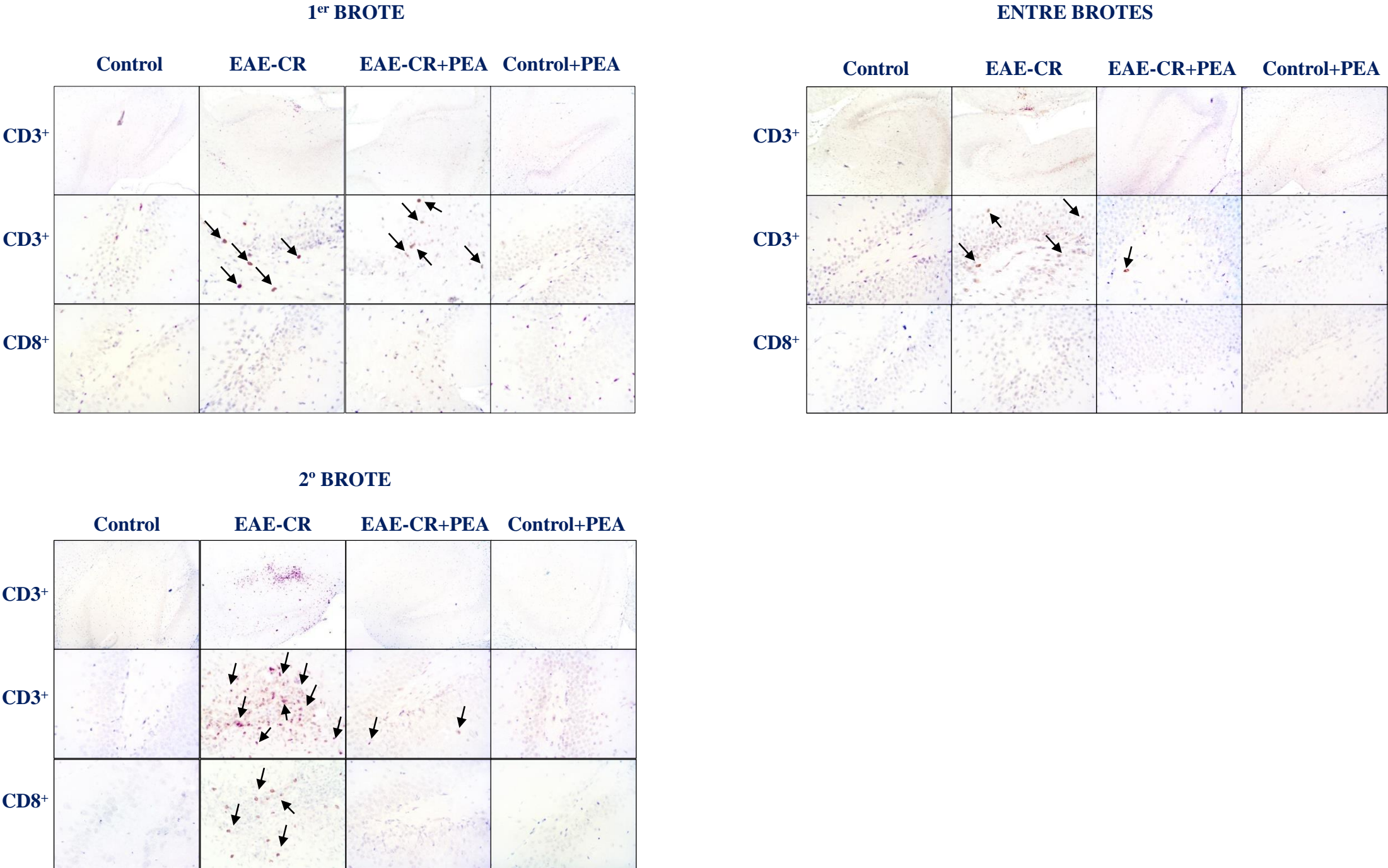


Figura 60: Estudio histológico de las células CD3⁺ y CD8⁺ en hipocampo de rata. En la figura se muestran fotografías de 40 aumentos (paneles superiores) y 200 aumentos (paneles inferiores) del hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Las imágenes son representativas de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, de ellos por duplicado.

Los resultados muestran que en el primer brote, el hipocampo de las ratas con EAE-CR presenta escasos y dispersos infiltrados celulares (**Figura 60**). En cambio, en el segundo brote, hay mayor cantidad de infiltrados de células $CD3^{+}$, especialmente en la zona de la comisura hipocampal, bajo la fimbria del hipocampo y en la capa molecular (**Figura 60**). En esta última área, se encuentran los acúmulos celulares más importantes. El estudio de la subpoblación de linfocitos $CD3^{+} CD8^{+}$ muestra que dichas células se distribuyen principalmente en la zona central de la placa inflamatoria. Por otro lado, en el primer brote, las ratas con EAE-CR+PEA presentan pequeños infiltrados difusos de células $CD3^{+}$ en la zona de la comisura. Además, estas ratas, al contrario que las ratas con EAE-CR, no presentan acúmulos de células $CD3^{+}$ en el hipocampo en ninguno de los tres brotes de la enfermedad (**Figura 60** y **Figura 61**).

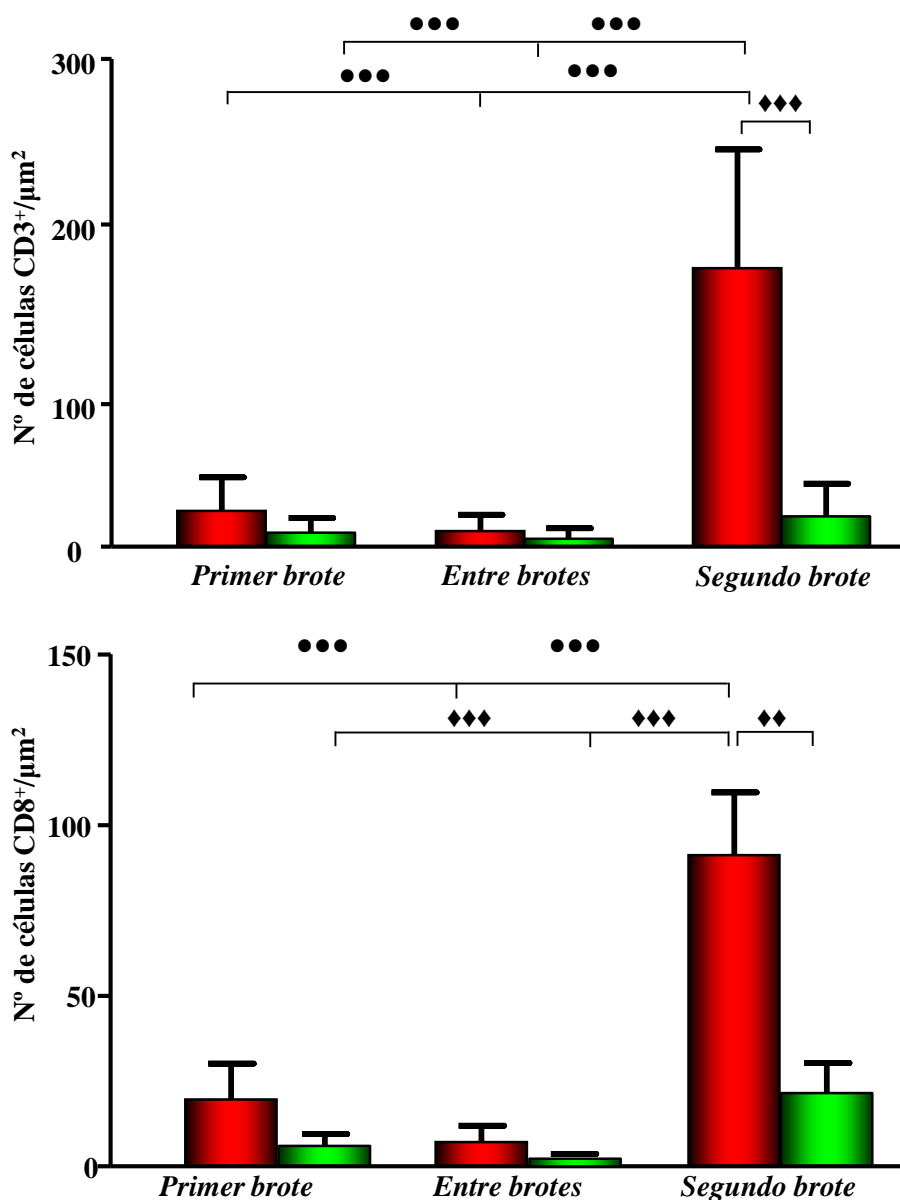


Figura 61: Histograma de células CD3⁺ y CD8⁺ infiltradas en el hipocampo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados se expresan como número de células CD3⁺ y CD8⁺ por μm² y se representan como la media ± E.S.M del recuento de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦p<0,05, ♦♦p<0,01, ♦♦♦p<0,001; Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●●●p<0,001.

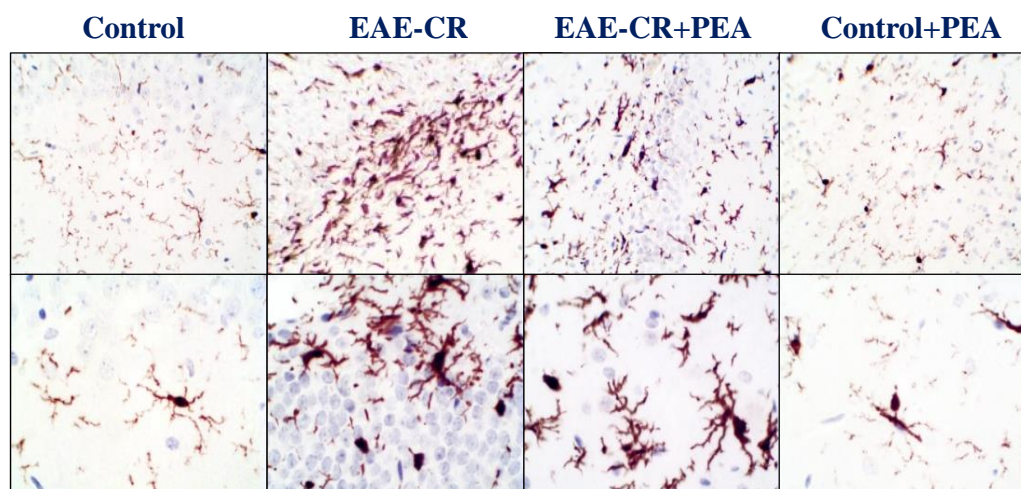
A continuación, se analizaron los niveles de células Iba-1⁺ y su grado de activación. Los resultados de las **Figura 62** y **Figura 63** muestran un aumento del número de células Iba-1⁺ en el hipocampo de las ratas con EAE-CR en comparación con las ratas control, tanto en el primer brote como en el segundo. Estas células se distribuyen por todo el hipocampo, aunque en el primer brote se centran principalmente

en la zona del hilus y en el estrato molecular mientras que en el segundo brote, se localizan principalmente en el estrato oriens (**Figura 62** y **Figura 63**). En las ratas con EAE-CR+PEA, como se muestra en la **Figura 62**, hay un aumento del número de células Iba-1⁺ en el segundo brote, principalmente en el estrato del oriens y en el estrato radiatum. El estudio de las prolongaciones de las células Iba-1⁺ en las ratas con EAE-CR muestra un aumento de la activación de las células Iba-1⁺, tanto en el primer como en el segundo brote, como puede verse en la **Figura 64**. Por otro lado, el grado de activación de las células Iba-1⁺ en las ratas con EAE-CR+PEA es mayor en el segundo brote, aunque menor que en las ratas con EAE-CR, como puede verse en la **Figura 64**.

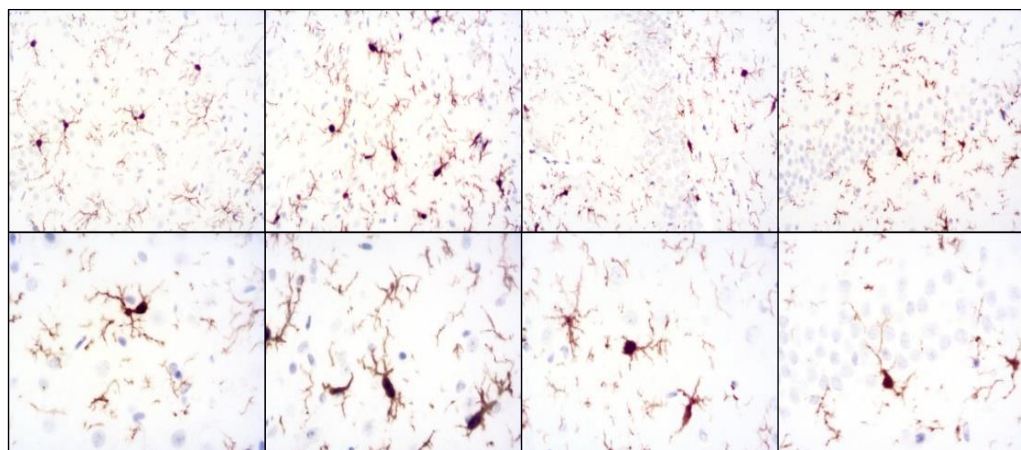
A continuación, se valoró si existían infiltrados de linfocitos B el hipocampo que pudieran contribuir a alterar este área cerebral. Para ello, se valoró la presencia de IgG en tejido. Los resultados de la **Figura 65** muestran que en las ratas con EAE-CR hay un aumento de los niveles de IgG en el segundo brote de la enfermedad en comparación con las ratas control. En las ratas con EAE-CR+PEA, también se observa un aumento de dichos niveles en el segundo brote, aunque es mucho menor en relación con las ratas con EAE-CR (**Figura 65** y **Figura 66**).

CÉLULAS Iba-1⁺ EN EL HIPOCAMPO

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

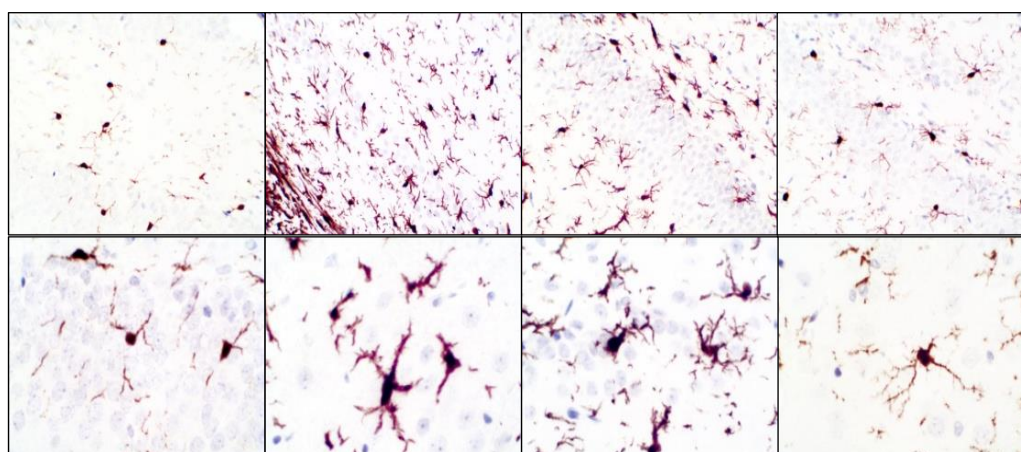


Figura 62: Estudio de las células Iba-1⁺ en el hipocampo de rata. En la figura, se muestran las fotografías de 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) del hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado.

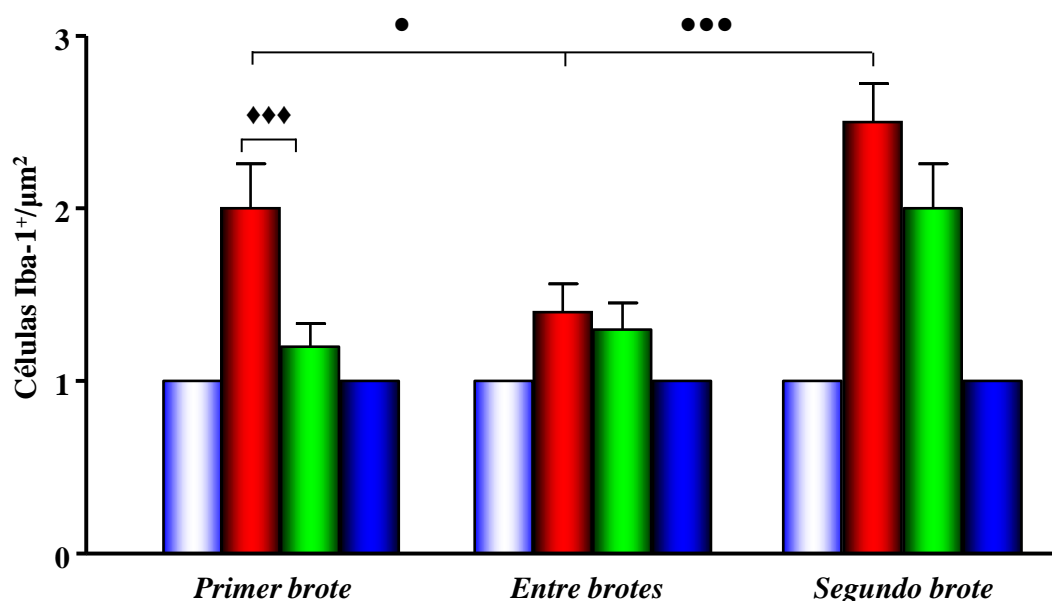


Figura 63: Histograma representativo del número de células Iba-1⁺ infiltradas en el hipocampo de ratas control (■), ratas con EAE-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración de la densidad de células por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. La escala de valoración de la intensidad de señal: nula=0, baja=1, moderada=2, alta=3. Comparación estadística frente a EAE: ♦♦♦ $p<0,001$; Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ● $p<0,05$; ●●● $p<0,001$.

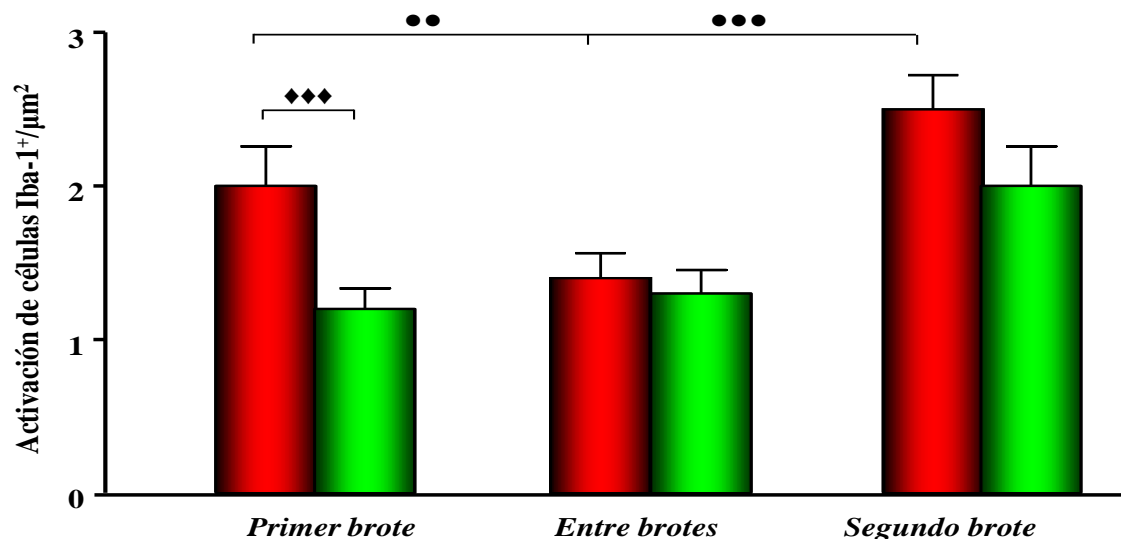


Figura 64: Histograma representativo del grado de activación de las células Iba-1⁺ en el hipocampo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración del grado de activación por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 5-10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. La escala de valoración de la intensidad de señal: nula=0, baja=1, moderada=2, alta=3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦♦♦ $p<0,001$. Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●● $p<0,01$; ●●● $p<0,001$.

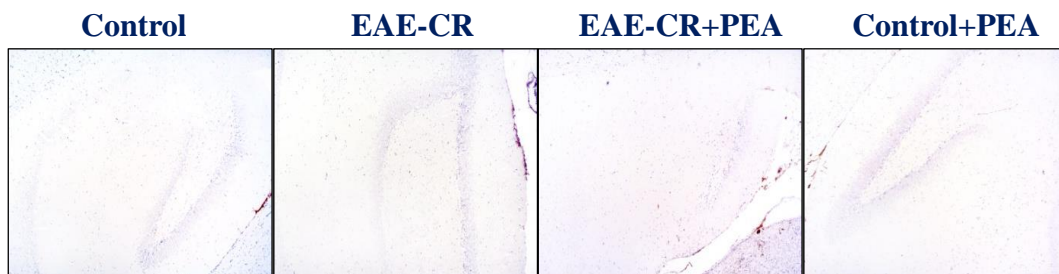
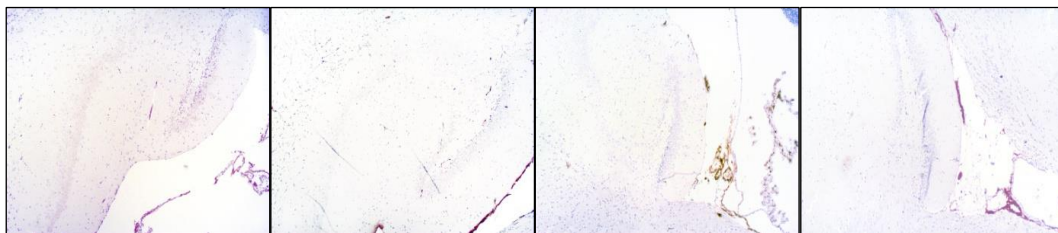
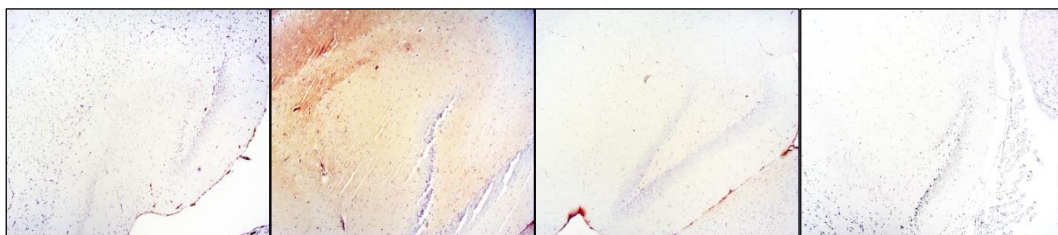
INMUNOGLOBULINA G EN EL HIPOCAMPO**1^{er} BROTE****ENTRE BROTES****2^ºBROTE**

Figura 65: Estudio de la IgG en el hipocampo de rata. En la figura, se muestran las fotografías de 40 aumentos de los niveles de IgG detectados por inmunohistoquímica en el hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco tinciones independientes realizados por duplicado.

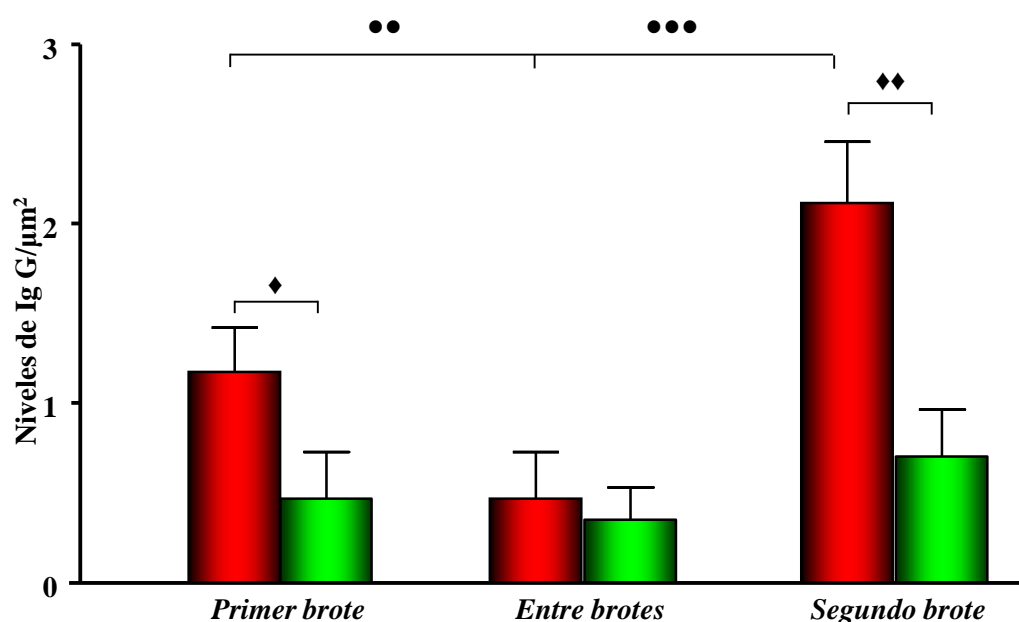


Figura 66: Histograma representativo de los niveles de IgG en el hipocampo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se muestran como una escala de valoración del nivel de IgG por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del estudio de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. La escala de valoración de la intensidad de señal: nula=0, baja=1, moderada=2, alta=3. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦ $p < 0,05$, ♦♦ $p < 0,001$. Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●● $p < 0,01$; ●●● $p < 0,001$.

Dada las infiltraciones de linfocitos encontrados y la activación de las células microgliales, se decidió evaluar los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en extractos de hipocampo. Los resultados obtenidos en las ratas con EAE-CR muestran un aumento de los niveles de TNF- α en dichos extractos, tanto en el primer brote como en el segundo (**Figura 67**), en comparación con las ratas control. Asimismo, los niveles de IFN- γ estaban elevados en los tres periodos de la enfermedad en dichas ratas (**Figura 68**). Además, en el periodo entre brotes, los extractos hipocampales de las ratas con EAE-CR presentan niveles significativamente mayores de IFN- γ que en las ratas con EAE-CR+PEA.

Los resultados obtenidos en las ratas con EAE-CR+PEA no muestran aumentos de los niveles de TNF- α en ninguno de los brotes de la enfermedad, aunque sí se observa un aumento de los niveles de IFN- γ en el segundo brote, mientras que los niveles de esta citoquina están aumentados en las ratas control+PEA en el segundo brote (**Figura 68**).

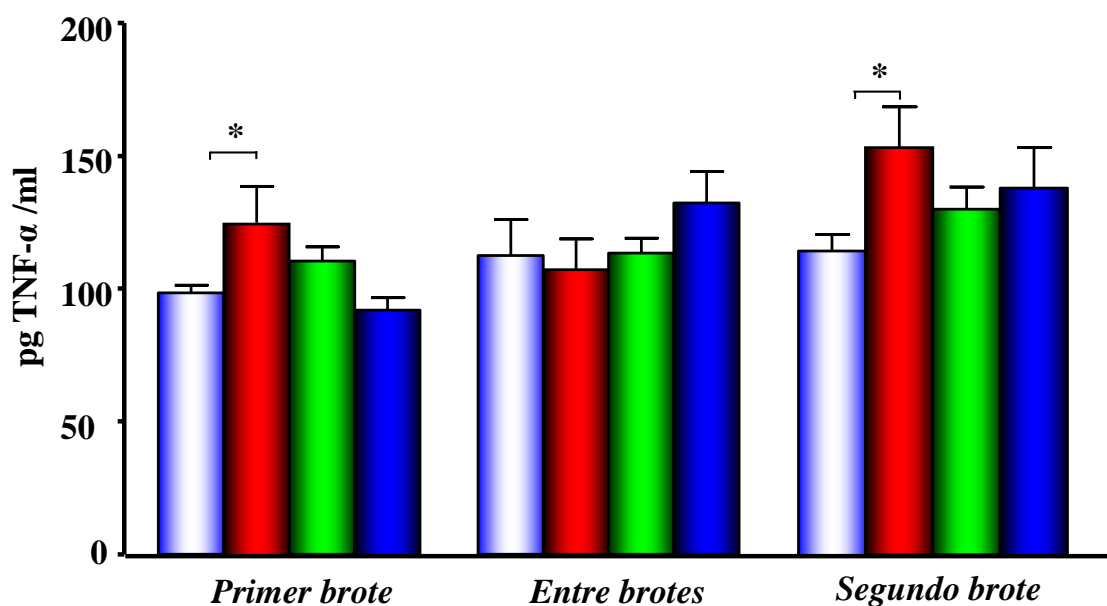


Figura 67: Niveles de TNF- α en extracto (fracción soluble) de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAR-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5) y ratas control+PEA (■, n=5). El estudio se realizó en las tres fases de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados se expresan como picogramos de TNF- α por mililitro de extracto y representan la media \pm E.S.M de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: *p<0,05.

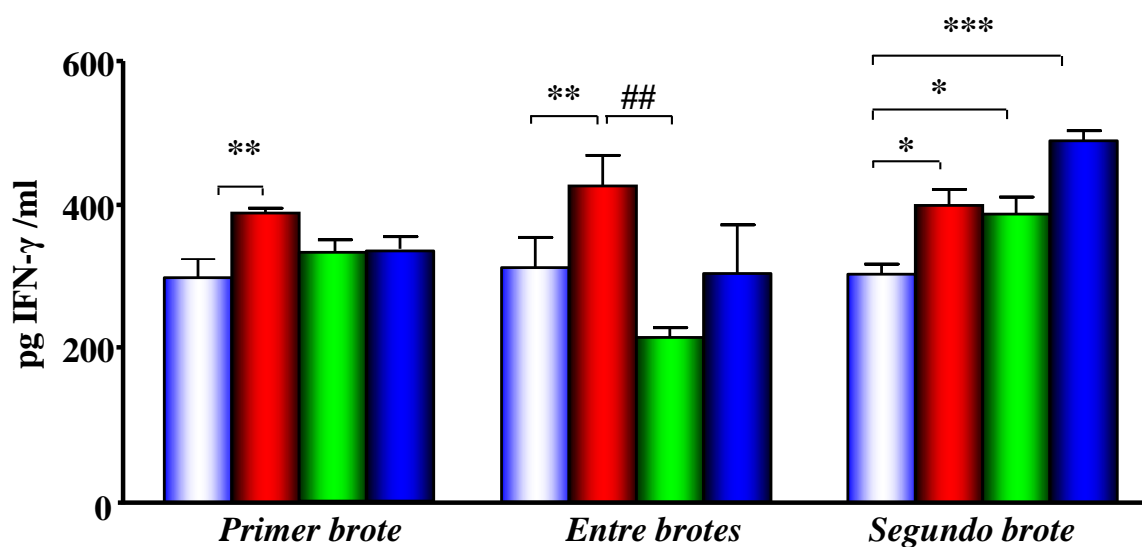


Figura 68: Niveles de IFN- γ en extracto (fracción soluble) de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAR-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5) y ratas control+PEA (■, n=5). El estudio se realizó en las tres fases de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados se expresan en picogramos de IFN- γ por mililitro de extracto y representan la media \pm E.S.M de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,005. Comparación estadística respecto a las ratas EAE-CR: ##p<0,01.

A continuación, analizamos los niveles proteicos de calcineurina en la fracción citoplasmática de hipocampo de rata, ya que esta fosfatasa dependiente de Ca^{2+} es reclutada por el $\text{TNF-}\alpha$ para estimular la vía canónica de inflamación. Como puede observarse en la **Figura 69**, los niveles de esta proteína están aumentados en el primer brote de la enfermedad, en el hipocampo de las ratas con EAE-CR así como en las ratas con EAE-CR+PEA en comparación con las ratas control. En el periodo entre brotes, no se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales estudiados mientras que en el segundo brote, se vuelve a observar un aumento de los niveles de calcineurina en la fracción citoplasmática de hipocampo de las ratas con EAE-CR+PEA.

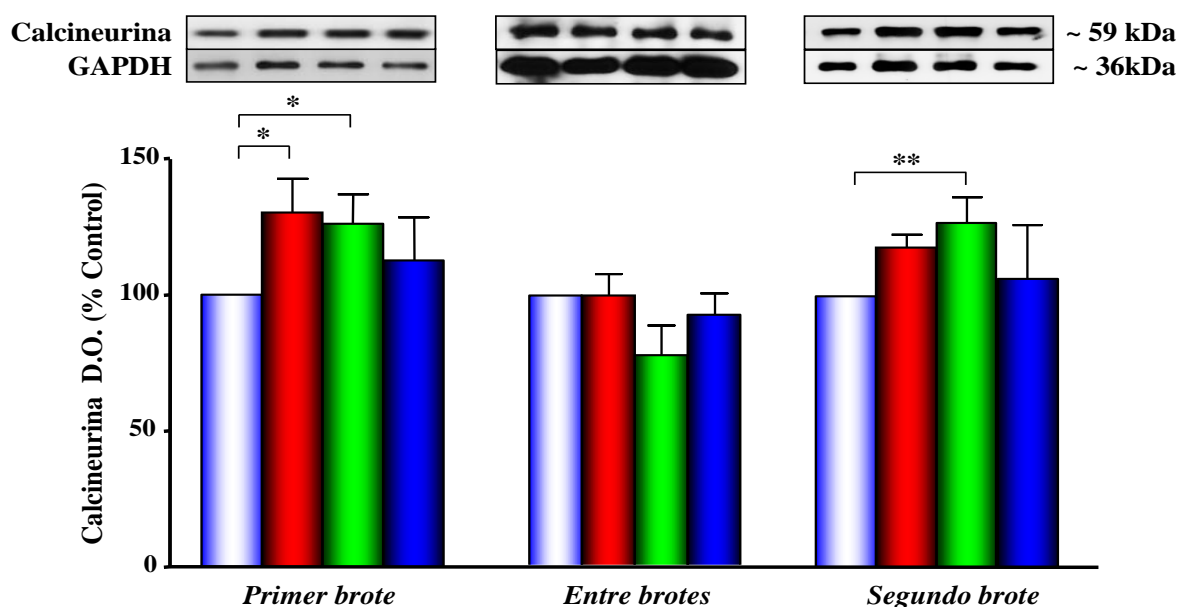
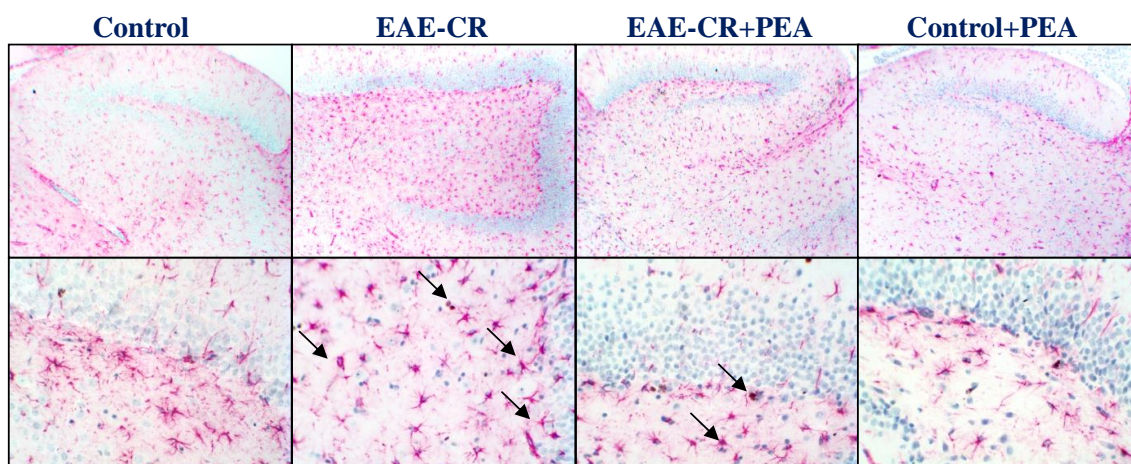


Figura 69: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de la calcineurina en hipocampo de ratas control (■), ratas con EAE-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó GAPDH, detectada con un anticuerpo monoclonal. Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, a cuya densidad óptica, una vez normalizada con GAPDH, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Dado los infiltrados de células inmunes, el aumento de las citoquinas proinflamatorias y los niveles de calcineurina en el hipocampo de ratas con EAE-CR, nos propusimos evaluar un tipo de célula glial involucrada en el mantenimiento de las neuronas, los astrocitos. Para ello, realizamos una tinción doble con proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para la detección de astrocitos y además realizamos una tinción con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para determinar si existía proliferación de este tipo celular.

GFAP/PCNA EN EL HIPOCAMPO

1ºBROTE



2ºBROTE

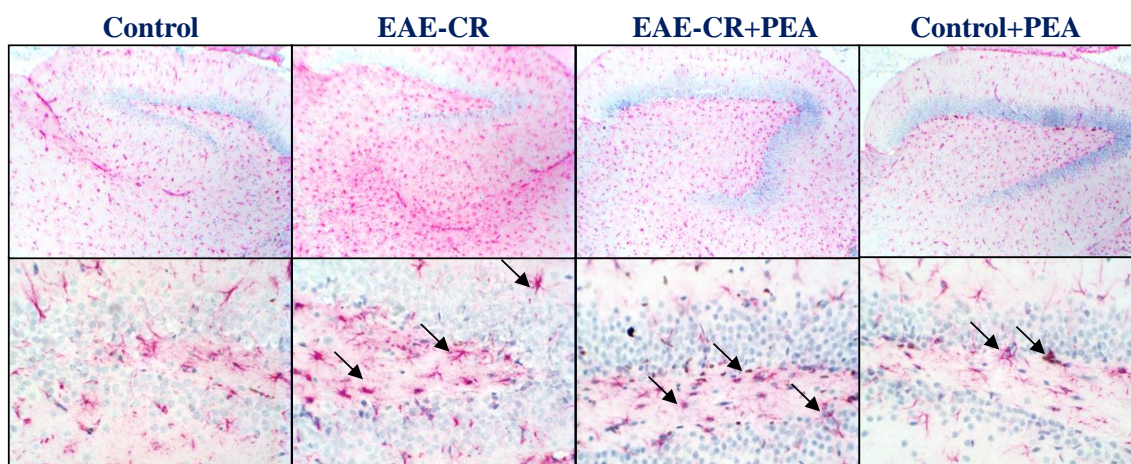


Figura 70: Estudio de las células GFAP/PCNA en el hipocampo de rata. En la figura, se muestran las fotografías de 40 aumentos (paneles superiores) y 200 aumentos (paneles inferiores) del hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en el primer y segundo brote de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado.

Los resultados de la **Figura 70** muestran que las ratas con EAE-CR presentan un aumento del número de proyección de los astrocitos y además un aumento del grosor de sus proyecciones tanto en el primer brote como en el segundo, en comparación con las ratas control. En estas ratas no se observan células GFAP/PCNA. En el caso de las ratas con EAE-CR+PEA se observa que los astrocitos presentan un menor número de proyecciones que las ratas con EAE-CR.

Por otro lado, en el hipocampo de las ratas con EAE-CR+PEA y en las ratas control+PEA, se observan además células GFAP/PCNA positivas, lo que nos indica que en el hipocampo de estas ratas proliferan astrocitos tanto en el primer brote como en el segundo.

El siguiente paso fue valorar si los niveles de citoquinas proinflamatorias, los infiltrados de células inmunes y los niveles de inmunoglobulina G detectados se podrían traducir en un aumento de muerte neuronal. Para dicha evaluación, se realizó una tinción *in situ* de núcleos apoptóticos de hipocampo mediante la técnica de TUNEL.

CÉLULAS TUNEL (+) EN EL HIPOCAMPO

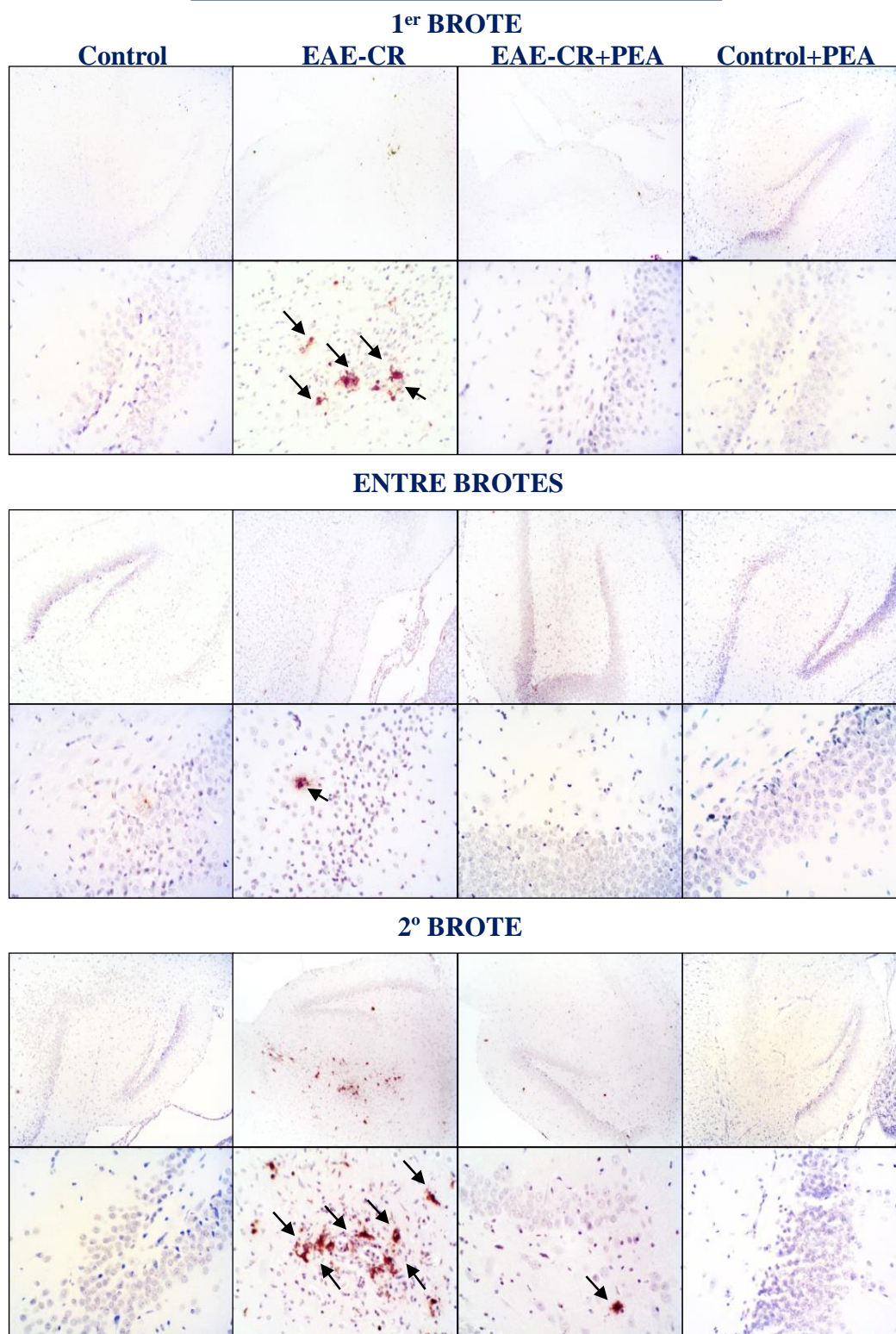


Figura 71: Tinción de TUNEL en el hipocampo de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 200 aumentos (paneles superiores) y 400 aumentos (paneles inferiores) de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco tinciones independientes realizadas, cada una, por duplicado.

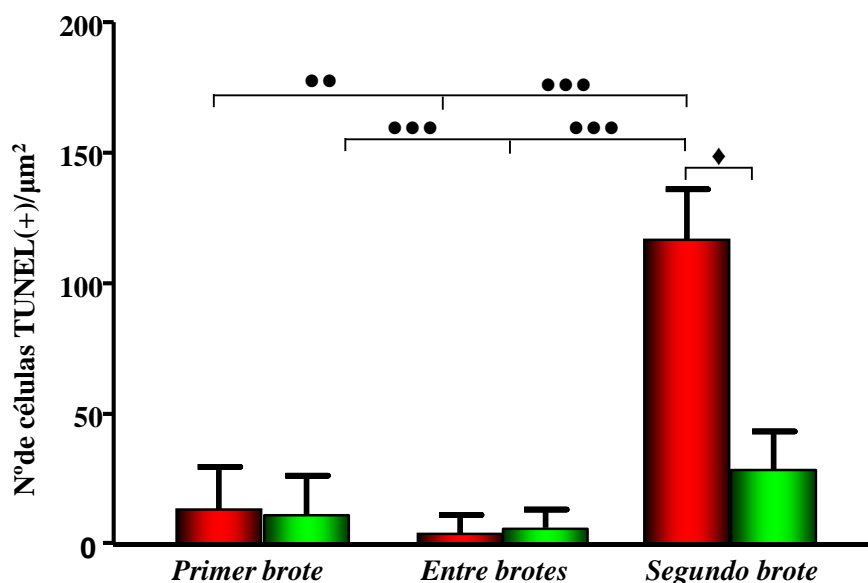


Figura 72: Histograma de células TUNEL(+) en el hipocampo de ratas con EAE-CR (■) y ratas con EAE-CR+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran el número de células TUNEL(+) por μm^2 y se representan como la media \pm E.S.M del recuento de 10 campos por muestra, de cinco experimentos independientes realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: ♦ $p<0,05$. Comparación estadística entre los distintos brotes de la enfermedad: ●● $p<0,01$; ●●● $p<0,001$.

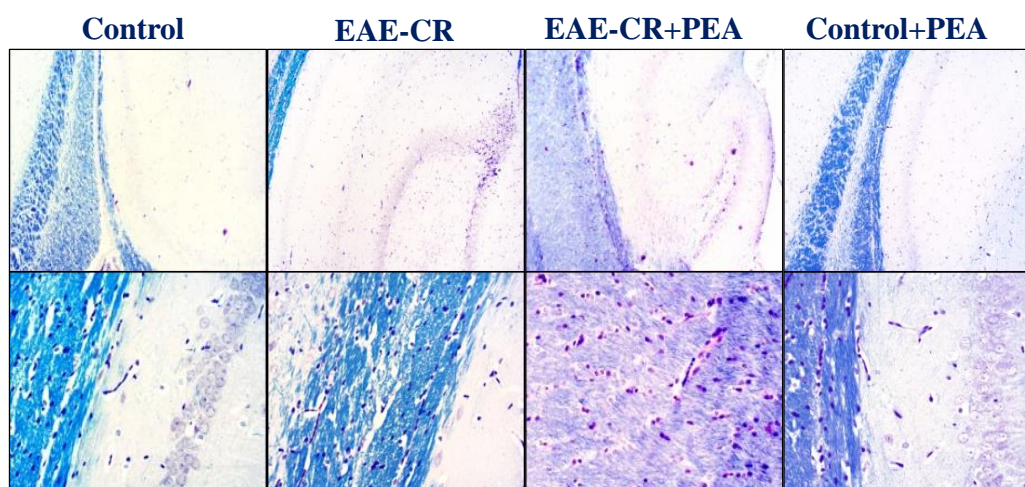
Como puede verse en la **Figura 71**, en el hipocampo de las ratas con EAE-CR, hay un aumento significativo de células TUNEL(+) en el segundo brote, especialmente en el estrato molecular y en el estrato radiatum (**Figura 72**) mientras que en las ratas con EAE-CR+PEA, se observa un menor número de células TUNEL(+) en dicha área.

Como hemos comentado anteriormente, el hipocampo está conectado con otras áreas del sistema límbico formando el circuito de Papez. Este circuito, que interviene en los procesos de la memoria a corto plazo, conecta el hipocampo con los cuerpos mamilares (por medio del fornix) y éstos con el tálamo a través del haz mamilotalámico. Los núcleos talámicos conectan con la circunvolución del cíngulo, la cual conecta con el hipocampo mediante fibras de asociación.

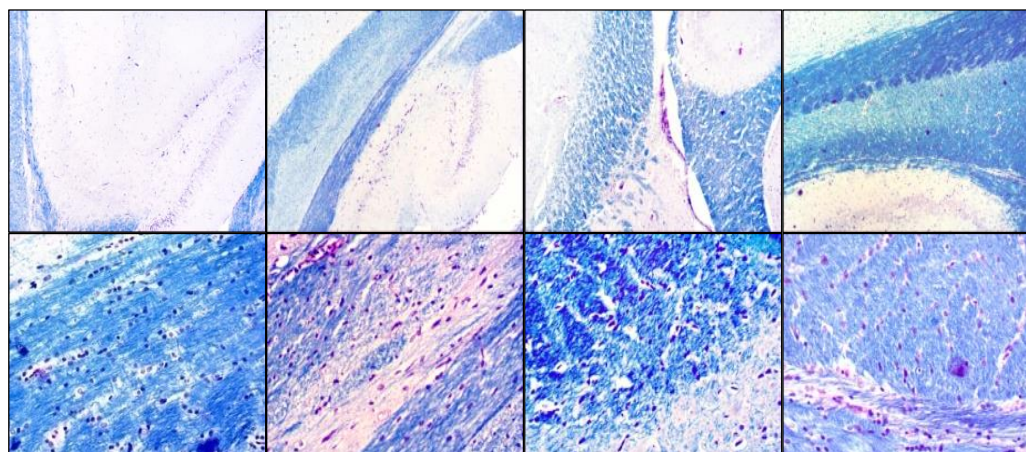
Dadas las conexiones entre las diferentes áreas, el siguiente paso en nuestro estudio se encaminó a analizar el grado de desmielinización en las ramas aferentes y eferentes del hipocampo, para lo que se realizaron tinciones con *Fast Blue/PAS*. Los resultados de la **Figura 73** muestran que el hipocampo de ratas con EAE-CR presenta grandes placas desmielinizantes en la zona del alveus, tanto en el periodo entre brotes como en el segundo brote, mientras que en las ratas con EAE-CR+PEA, sólo se detectan placas desmielinizantes en el segundo brote en dicha área cerebral.

TINCIÓN FAST BLUE/ PAS DEL HIPOCAMPO

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

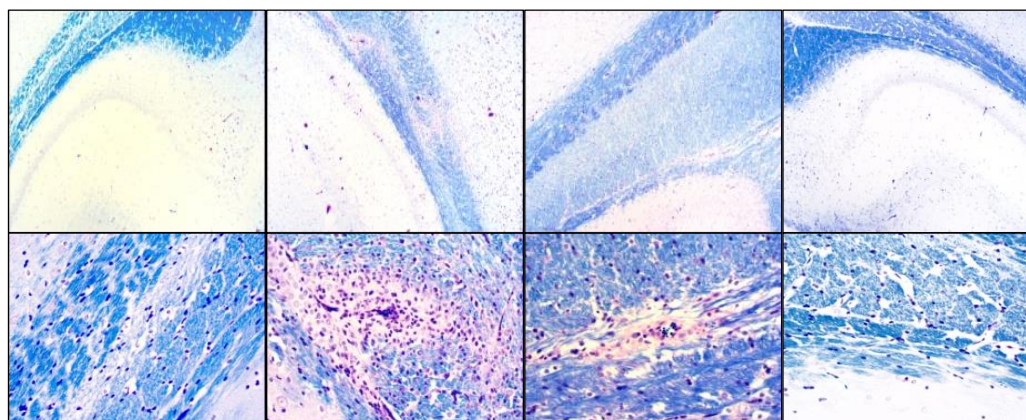


Figura 73: Tinción Fast Blue/PAS del hipocampo de rata. En la figura, se muestran las fotografías con 40 aumentos (paneles superiores) y 200 aumentos (paneles inferiores) del hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco animales por grupo.

**TINCIÓN FAST BLUE/PAS DE LA CONEXIÓN
HIPOCAMPO-CUERPOS MAMILARES**

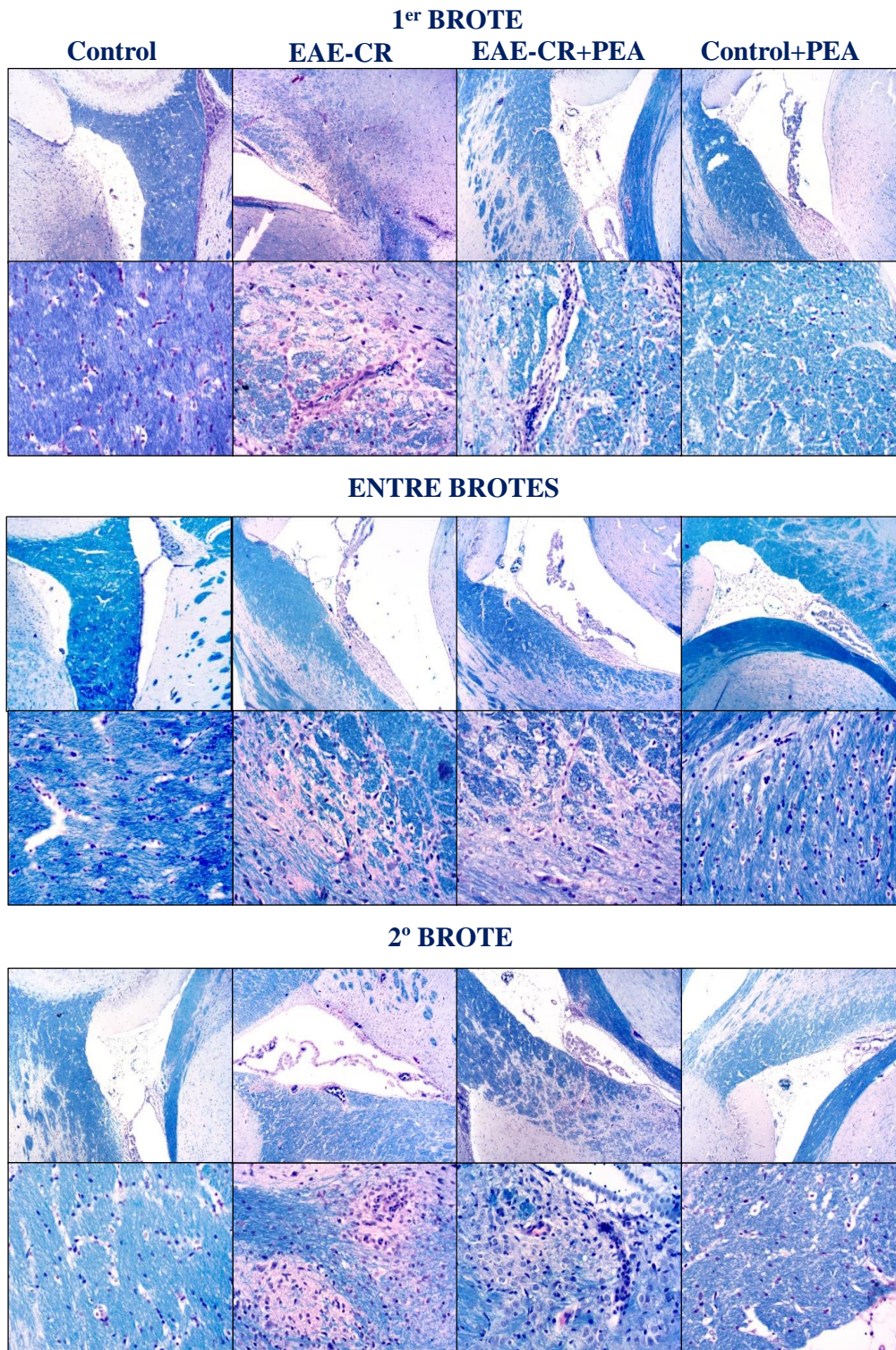


Figura 74: Tinción Fast Blue/PAS del hipocampo a los cuerpos mamilares. En la figura, se muestran las fotografías con 40 aumentos (paneles superiores) y 200 aumentos (paneles inferiores) del cerebro de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados son representativos de cinco animales por grupo.

Los resultados de la **Figura 74** muestran que en las ratas con EAE-CR, en los tres periodos de la enfermedad, existen placas desmielinizantes en las fibras nerviosas eferentes del hipocampo y conectan con los cuerpos mamilares, mientras que en las ratas con EAE-CR+PEA, dichas placas son de menor tamaño.

D. ESTADO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL HIPOCAMPO DE RATAS CON ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL CRÓNICA RECIDIVANTE

El estrés oxidativo, como se ha explicado en la introducción, resulta de una desregulación entre los procesos biológicos que generan especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y los sistemas antioxidantes encargados de eliminarlos. En la EM, el estrés oxidativo juega un papel importante dado que en la fase inflamatoria, los linfocitos, macrófagos y microglía activos realizan una actividad citotóxica mediante la producción de ERO, en la fase degenerativa, la pérdida de mielina podría estar producida, al menos en parte, por los radicales libres generados. Hasta el momento, los estudios de estrés oxidativo en la EM se han centrado principalmente en la sustancia blanca. Por ello, en el siguiente apartado, se valoró los niveles de peroxidación lipídica y la actividad de las defensas antioxidantes como son las enzimas SOD, CAT, GR, GPx en el hipocampo de ratas con EAE-CR, así como el posible efecto de la sal de PEA en dichas defensas. También se quiso valorar en los animales con EAE-CR+PEA, que llegaban a grado 3 de la enfermedad, el estado de dichas defensas antioxidantes. A estas ratas se las denominan EAE-CR+PEA (1).

D.1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los radicales libres, entre ellos, el radical hidroxilo (HO^\bullet), son capaces de sustraer un hidrógeno a los grupos metilo ($-\text{CH}_2-$) de las cadenas de los lípidos poliinsaturados, generando una reacción en cadena denominada peroxidación de lípidos. El SNC contiene una gran cantidad de lípidos poliinsaturados en sus membranas, especialmente en los oligodendrocitos, por lo que es muy sensible al estrés oxidativo. Por ello, medir el grado de peroxidación lipídica es un buen indicador del daño celular producido por dichos radicales.

Como se observa en la **Figura 75**, el nivel de peroxidación lipídica en el hipocampo es mayor en las ratas con EAE-CR que en las ratas control, tanto en el

primero brote como en el segundo mientras que en el periodo entre brotes vuelven a los valores control. En las ratas EAE-CR+EAP, no se aprecian diferencias significativas en el grado de peroxidación lipídica en comparación con el grupo control. Las ratas con EAE-CR+EAP (1) presentan el mismo grado de peroxidación lipídica que las ratas con EAE-CR. El análisis de los brotes entre sí muestra que en el segundo brote, el grado de peroxidación lipídica es significativamente mayor que en el primer brote o en el periodo entre brotes.

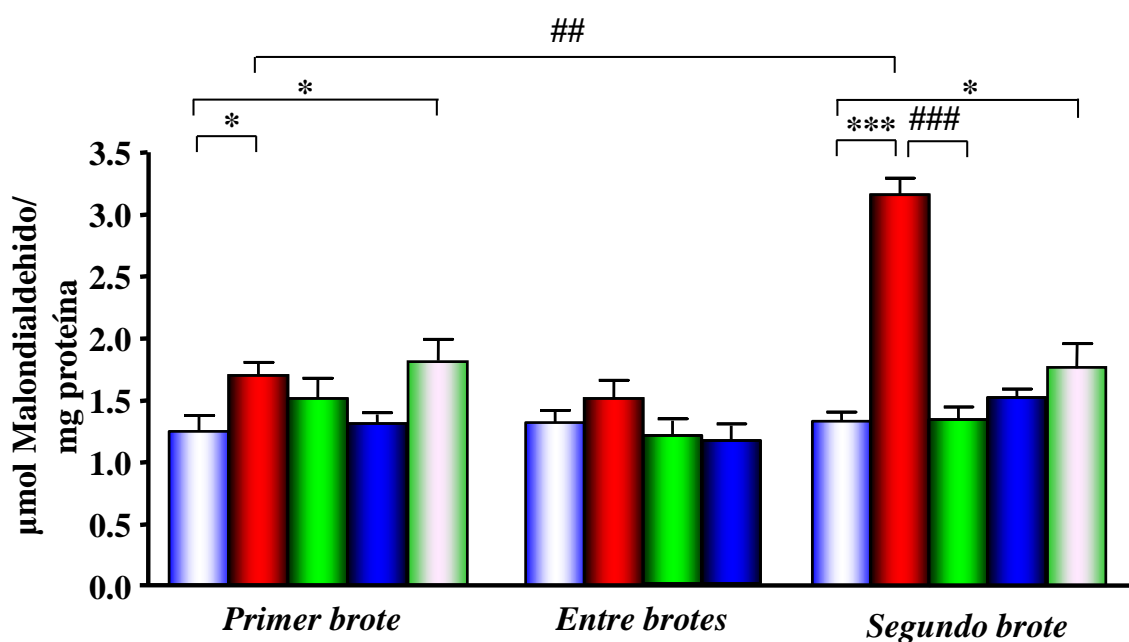


Figura 75: Niveles de malondialdehído en membranas de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5), ratas control+PEA (■, n=5) y ratas con EAE-CR+PEA (1) (■, n=5). El estudio se realizó en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran los μ moles de malondialdehído por mg de proteína y representan la media \pm E.S.M de cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Comparación estadística respecto al grupo EAE-CR: ### $p < 0,01$.

D.2. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

A la vista de los resultados de peroxidación lipídica, se procedió a valorar el estado de las defensas antioxidantes, realizando un análisis detallado de los sistemas de detoxificación de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el sistema del glutathione.

D.2.1. Actividad y niveles de superóxido dismutasa

La SOD es la enzima encargada de la transformación del radical superóxido (O^{\bullet}) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el presente estudio, se analizó la actividad de la SOD en extractos citoplasmáticos de hipocampo de rata con EAE-CR así como el efecto de la sal de PEA sobre este parámetro. En la **Figura 76**, puede observarse que la actividad de la enzima se encuentra aumentada en las ratas con EAE-CR, tanto en el primer brote como en el segundo, en comparación con el grupo control. Por otro lado, no se detectan diferencias significativas en las ratas con EAE-CR+PEA respecto al control, aunque sí existen diferencias significativas frente a las ratas con EAE-CR en el primer brote. En las ratas con EAE-CR+EAP (1) sacrificadas en grado 3, la actividad es similar a la de las ratas con EAE-CR.

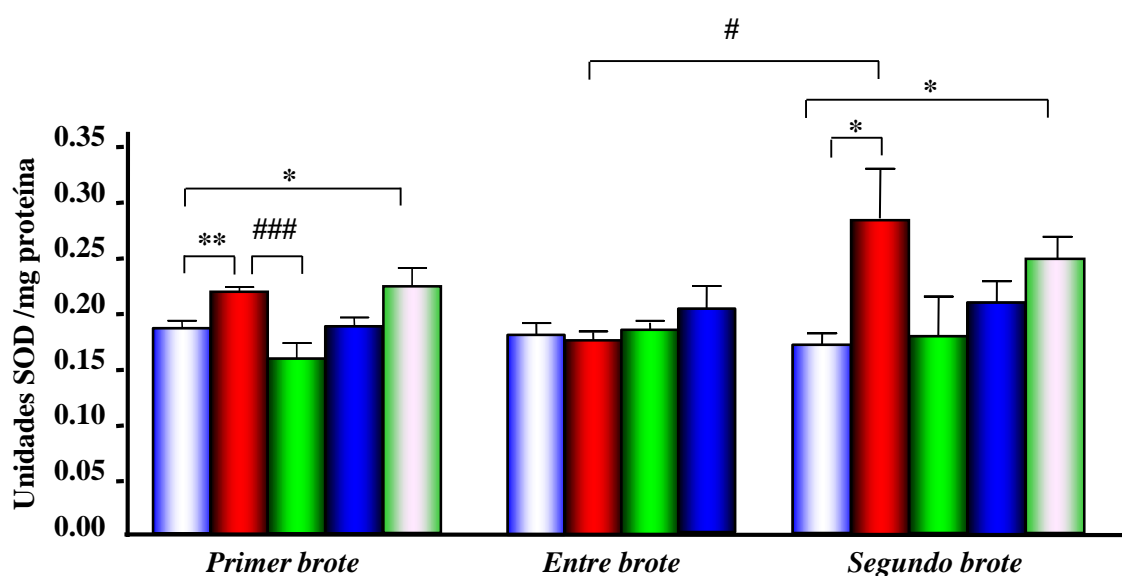


Figura 76: Actividad de la superóxido dismutasa en extracto de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5), ratas control+PEA (■, n=5) y ratas con EAE-CR+PEA (1) (■, n=5). Los estudios se realizaron en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Comparación estadística frente al EAE-CR: ### $p < 0,001$.

A continuación, se quiso valorar si el aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se correlacionaba con un aumento en los niveles proteicos de la misma. Como se muestra en la **Figura 77**, se detecta un aumento en los niveles proteicos de dicha enzima en extractos citoplasmáticos de hipocampo de ratas con EAE-

CR en el primer brote. No obstante, en el segundo brote no hay diferencias significativas entre las ratas con EAE-CR y las ratas control.

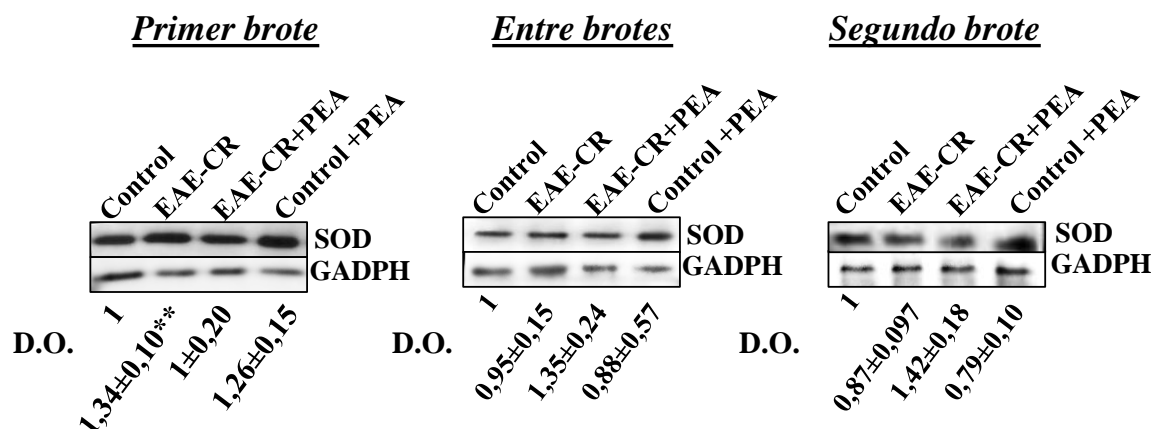


Figura 77: Niveles proteicos de la superóxido dismutasa en extracto de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA. EL estudio se realizó en el primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media ± E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: **p<0,01.

D.2.2. Actividad y niveles de la catalasa

El H_2O_2 es el producto generado por la actividad de la SOD y, aunque no es un radical libre, presenta una alta reactividad. El H_2O_2 es capaz de reaccionar con un electrón, produciendo HO^\bullet y agua. Para evitar esta reacción en el organismo, se disponen de dos sistemas antioxidantes, la catalasa (CAT) y el sistema del glutathion.

La CAT es capaz de escindir el H_2O_2 en oxígeno y agua. Por ello el siguiente paso fue determinar el estado de la CAT en las ratas con EAE-CR así como en las ratas con EAE-CR+PEA. En la **Figura 78**, se muestra que la actividad enzimática de la CAT está disminuida en ambos grupos en las tres fases de la enfermedad en comparación con las ratas control. Por otro lado, en el segundo brote, se observan diferencias significativas en la actividad de la CAT entre las ratas con EAE-CR+PEA y con EAE-CR. Por el contrario, en las ratas con EAE-CR+EAP (1), la actividad de la enzima está disminuida en los tres periodos de la enfermedad.

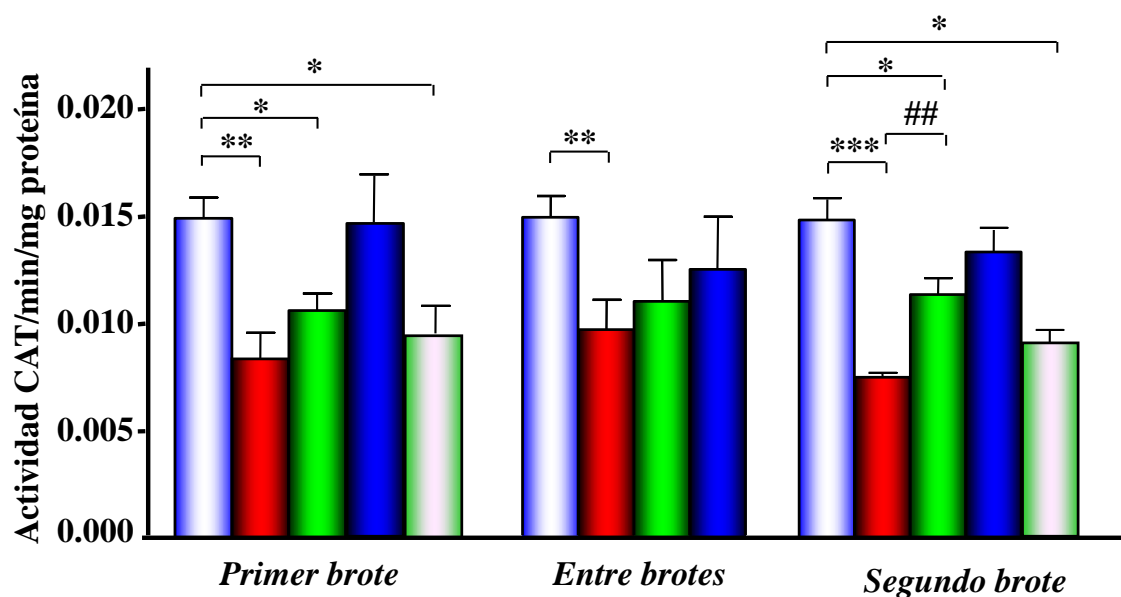


Figura 78: Actividad catalasa en extracto de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5), ratas control+PEA (■, n=5) y ratas con EAE-CR+PEA (1) (■, n=5). Los estudios se realizaron en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Comparación estadística frente al EAE-CR: ## $p < 0,01$.

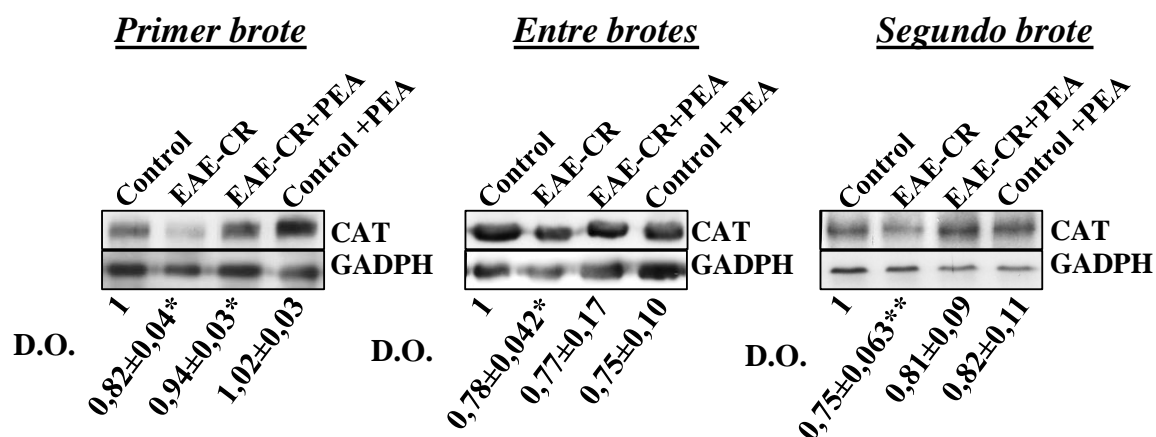


Figura 79: Niveles proteicos de la enzima catalasa en extracto de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA. El estudio se realizó en el primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Comparación estadística frente al EAE-CR: ## $p < 0,01$.

A continuación, se quiso comprobar si la disminución en la actividad de la CAT se correlacionaba con una disminución en los niveles proteicos de dicha enzima en extracto citoplasmático de hipocampo. Los resultados de la **Figura 79** muestran una

disminución de los niveles proteicos de la CAT en las ratas con EAE-CR en las tres fases de la enfermedad, en comparación con las ratas control.

D.2.3. Sistema del glutathion

A la vista de los resultados obtenidos, donde se observa un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, un aumento en la actividad de la SOD y una disminución de la actividad de la CAT, procedimos a valorar el sistema del glutathion en las ratas con EAE-CR y con EAE-CR+EAP. Para ello, se midieron las actividades enzimáticas y los niveles proteicos de la glutathion peroxidasa (GPx) y la glutathion reductasa (GR) así como los niveles de glutathion total (GSH-t), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en extracto citoplasmático de hipocampo.

D.2.3.1. Glutathion peroxidasa y glutathion reductasa

El sistema del glutathion es un sistema cíclico, capaz de escindir el H_2O_2 en dos moléculas de agua. Para ello, la enzima glutathion peroxidasa cataliza la combinación del H_2O_2 con glutathion reducido (GSH) dando lugar a glutathion oxidado (GSSG) y agua. Posteriormente, la enzima glutathion reductasa cataliza el reciclaje del GSSG a GSH. En la **Figura 80**, se muestra que en el primer brote de la enfermedad, la actividad de la glutathion peroxidasa, en extractos citoplasmáticos de hipocampo de las ratas con EAE-CR, está significativamente aumentada en comparación con las ratas control y ratas EAE-CR+EAP. Por el contrario, en el segundo brote, de la EAE-CR, se observa una disminución significativa de dicha actividad enzimática en comparación con las ratas control. En las ratas con EAE-CR+EAP (1) sacrificadas en el grado 3, la actividad GP está disminuida en el segundo brote, de modo similar a las ratas con EAE-CR. Con objetivo de determinar si existía una correlación entre estas modificaciones en las actividades enzimáticas y los niveles proteicos de dichas enzimas, se realizó un western blot. En la **Figura 81**, se observa un aumento de los niveles proteicos de la GP en el primer brote de ratas con EAE-CR y EAE-CR+EAP, mientras que en el segundo brote, los niveles proteicos de dicha enzima están disminuidos en las ratas con EAE-CR, comparados con las ratas control.

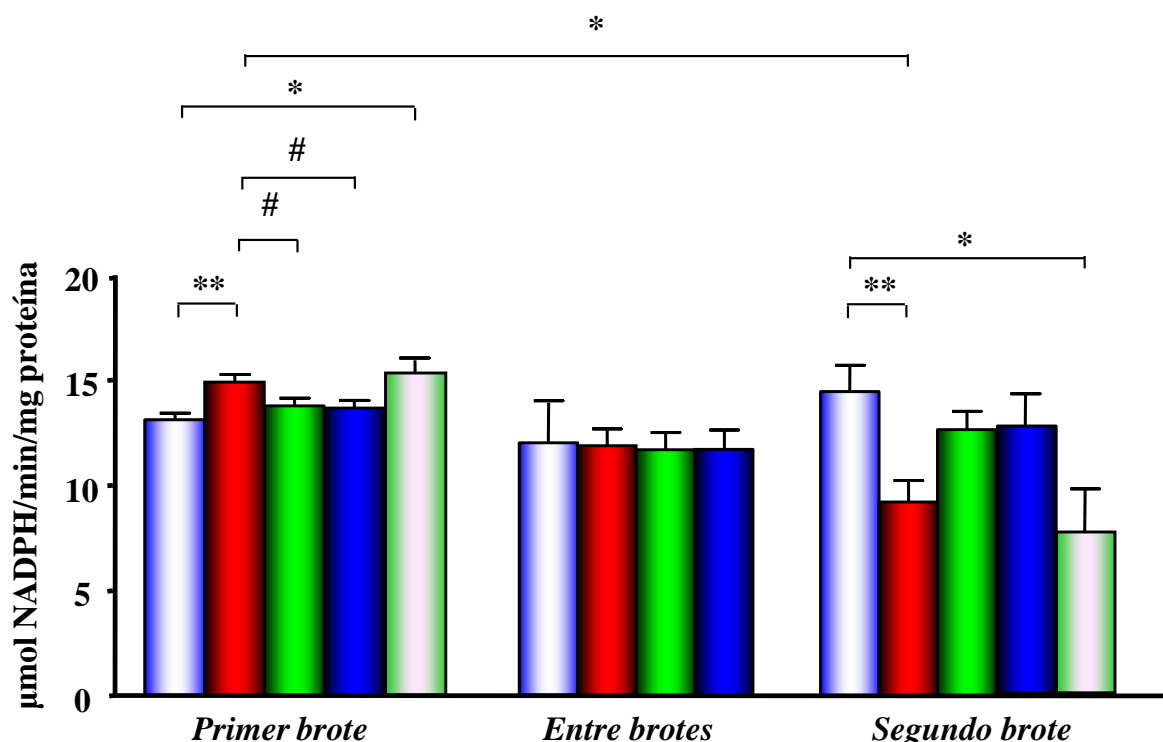


Figura 80: Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en extracto de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5), ratas control+PEA (■, n=5) y ratas con EAE-CR+PEA (1) (■, n=5). El estudio se realizó en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: *p<0,05, **p<0,01. Comparación estadística frente al EAE-CR: # p<0,05.

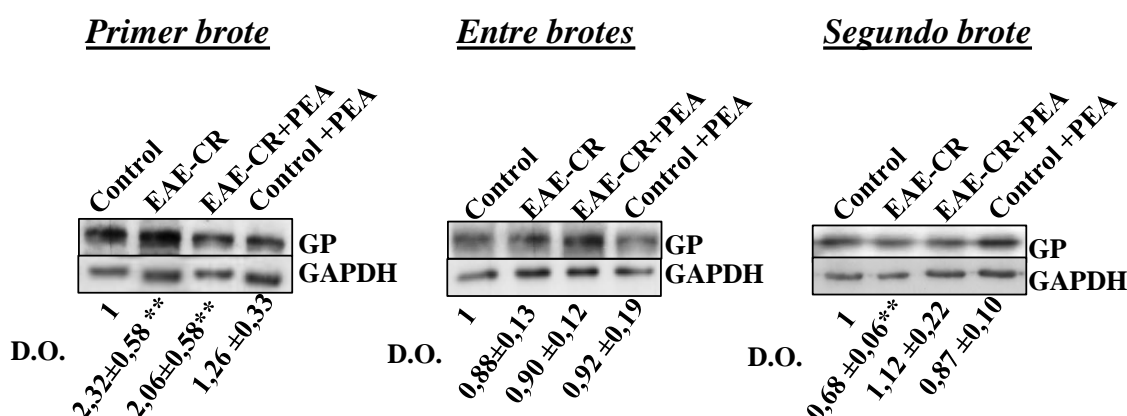


Figura 81: Niveles proteicos de la enzima glutatión peroxidasa en extracto de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: **p<0,01.

Como puede verse en la **Figura 82**, la actividad de la GR está aumentada significativamente en el hipocampo de ratas con EAE-CR, tanto en el primer brote como en el segundo, en comparación con las ratas control, mientras que en el periodo entre brotes, se observa una disminución en dicha actividad. Por otro lado, en las ratas con EAE-CR+EAP, no hay diferencias significativas en la actividad de la GR respecto al control. En las ratas con EAE-CR+EAP (1) sacrificadas en grado 3, se observa un aumento de la actividad de la GR tanto en el primer brote de la enfermedad como en el segundo.

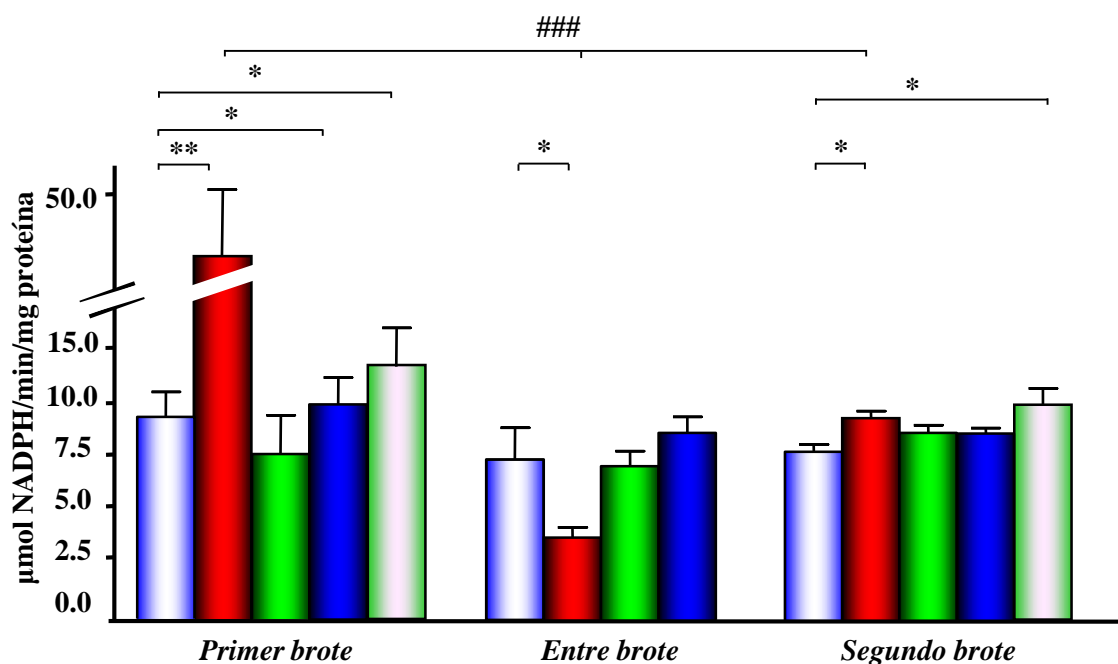


Figura 82: Actividad enzimática de la glutatión reductasa en extracto de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5), ratas control+PEA (■, n=5) y ratas con EAE-CR+PEA (1) (■, n=5). El estudio se realizó en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

La **Figura 83** muestra que en el primer brote, los niveles proteicos de la GR aumentan significativamente en las ratas con EAE-CR en comparación con las ratas control, lo que se correlaciona con el aumento de la actividad enzimática.

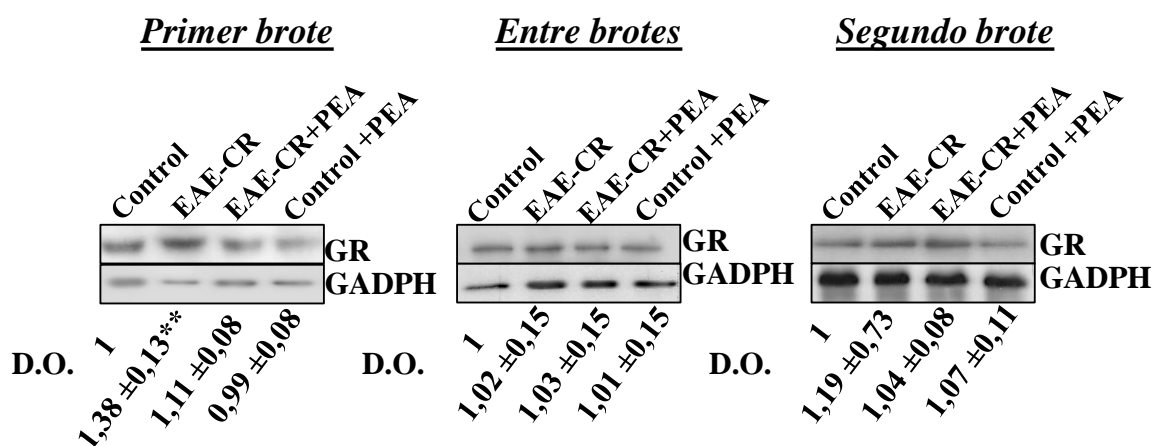


Figura 83: Niveles proteicos de la enzima glutation reductasa en extracto de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA, en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

D.2.3.2. Niveles de glutation total, reducido y oxidado

Para continuar con el estudio del sistema del glutation, se valoró los niveles de glutation total (GSH-t), glutation reducido (GSH) y glutation oxidado (GSSG) en hipocampo de ratas en las tres fases de la enfermedad con el fin de valorar si se correlaciona con las actividades de la enzimas descritas anteriormente. Los resultados de la **Figura 84** muestran que los niveles de GSH-t, en las ratas con EAE-CR, en las tres fases de la enfermedad, no se alteran significativamente en comparación con las ratas control, aunque sí se observan diferencias significativas de dichos niveles entre las ratas con EAE-CR y las ratas con EAE-CR+PEA en el segundo brote. En el primer brote de las ratas con EAE-CR, los niveles de GSH disminuyen mientras que los niveles de GSSG aumentan, de forma similar a lo que se detecta en las ratas con EAE-CR+PEA (1) sacrificadas en grado 3. Los niveles de GSH, tanto en el primer brote como en el periodo entre brotes, son significativamente menores en comparación con los niveles alcanzados en el segundo brote. En el periodo entre brotes, las ratas con EAE-CR presentan una disminución en los niveles de GSH mientras que en el segundo brote, hay un aumento en los niveles de GSH. La comparación estadística de los tres brotes de la enfermedad, en las ratas con EAE-CR, muestra diferencias significativas de los niveles de GSH-t entre el primer y segundo brote, así como diferencias de los niveles de GSH entre el primer y segundo brote, y diferencias de GSSG.

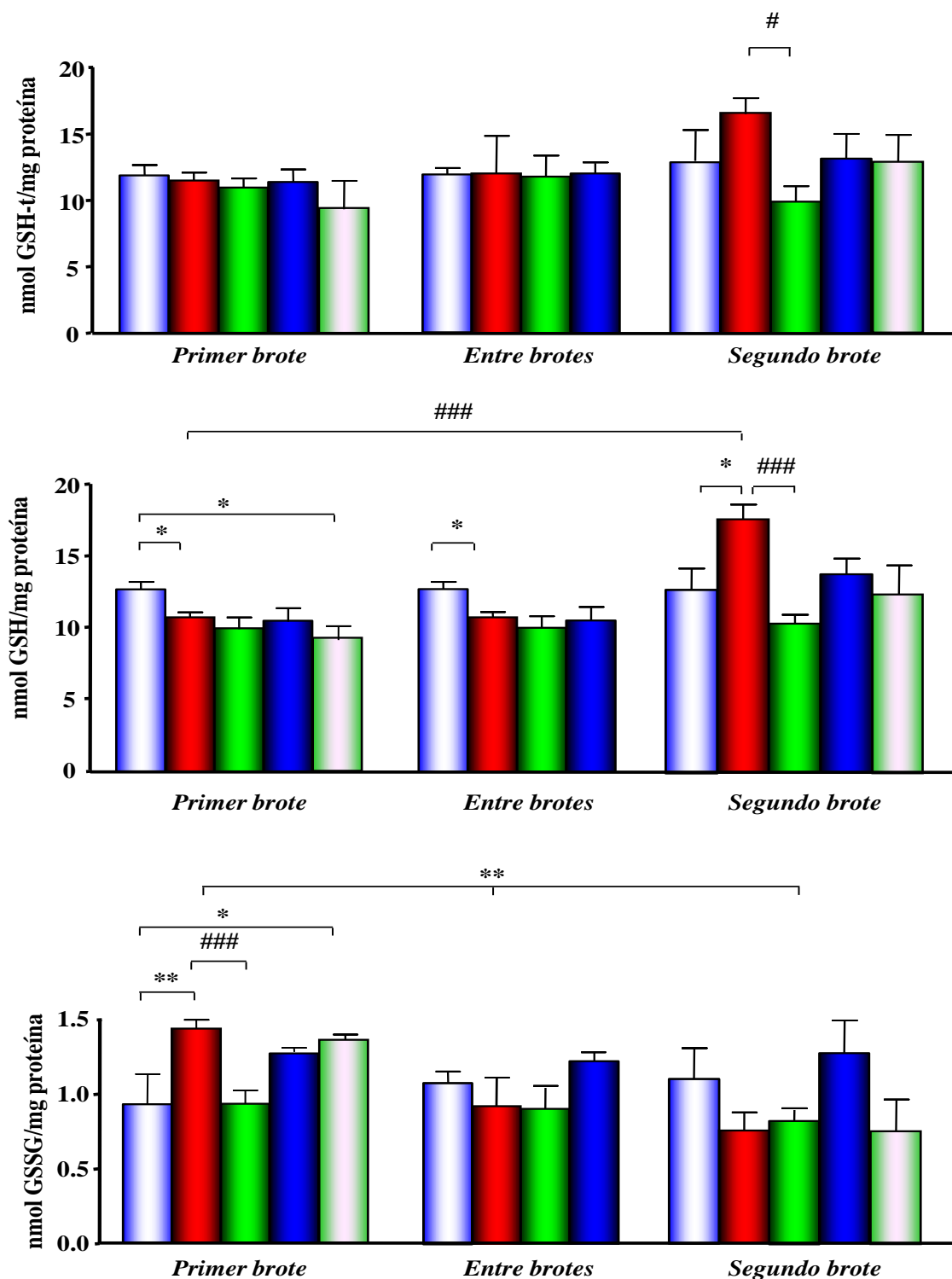


Figura 84: Niveles de glutatión total (GSH-t), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en extracto de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5), ratas control+PEA (■, n=5) y ratas con EAE-CR+PEA (1) (■, n=5) sacrificadas en grado 3. El estudio se realizó en las tres fases de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Comparación estadística frente al EAE-CR: ### $p < 0,001$.

D.3. NIVELES DE COLESTEROL Y DESMOSTEROL

Está demostrado que un aumento de estrés oxidativo conduce a un aumento de los niveles de colesterol en las membranas celulares. Por ello, se valoró a continuación los niveles de colesterol y desmosterol en las membranas de hipocampo de los distintos grupos experimentales mediante HPLC. Los resultados de la **Figura 85** muestran que tanto en las ratas con EAE-CR como en las ratas con EAE-CR+EAP, hay un aumento significativo en los niveles de colesterol en el primer y segundo brote. Estos valores retornan a los valores control en el periodo entre brotes. Asimismo, dichos cambios se relacionan con una disminución en los niveles de desmosterol en las membranas de hipocampo, tanto en el primer como en el segundo brote de la enfermedad.

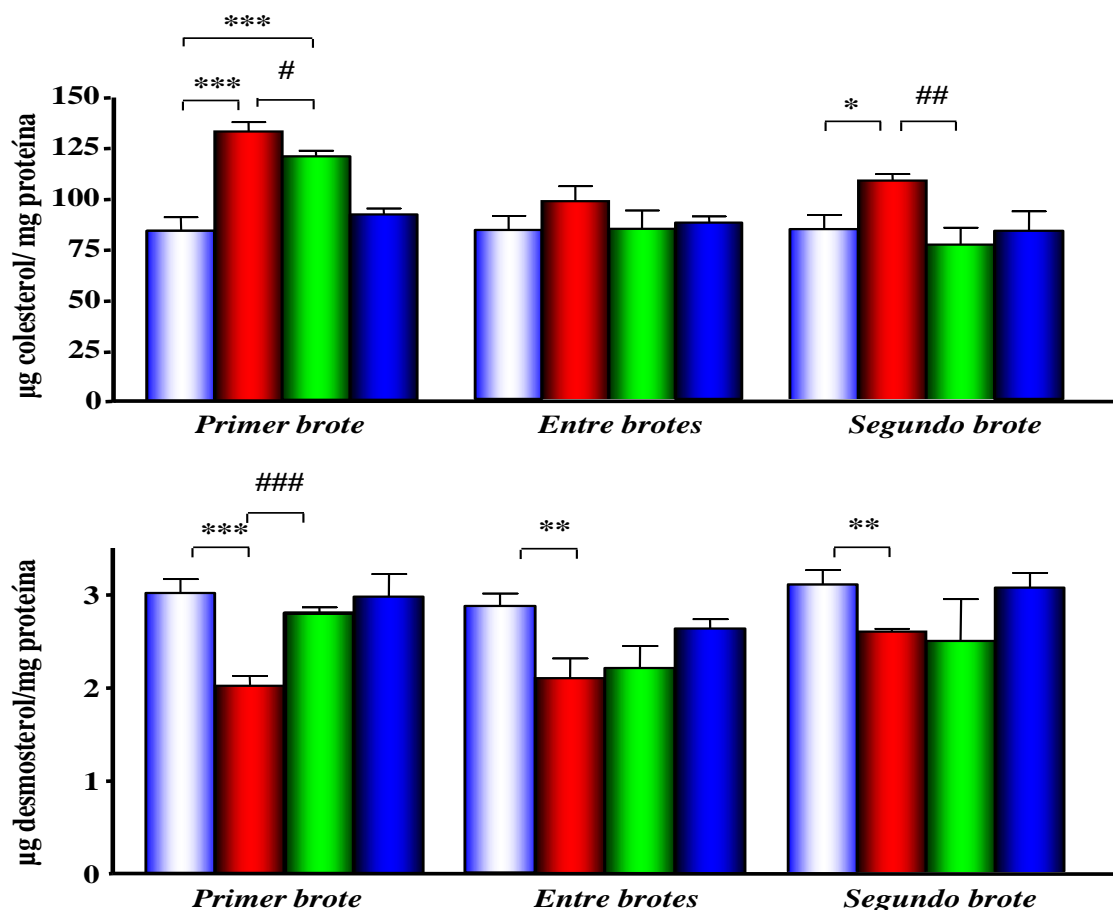


Figura 85: Niveles de colesterol y desmosterol en membranas de hipocampo de ratas control (■, n=5), ratas con EAE-CR (■, n=5), ratas con EAE-CR+PEA (■, n=5) y ratas control+PEA (■, n=5) sacrificadas en las tres fases de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los resultados muestran la media \pm E.S.M. de cinco experimentos realizados, cada uno, por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Comparación estadística frente al EAE-CR: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

E. EXPRESIÓN DE LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G Y β -ARRESTINAS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS CON EAE-CR Y EFECTO DE LA SAL DE PEA

En los procesos inflamatorios, la señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) desencadena la actividad de múltiples mediadores incluyendo quimioquinas, leucotrienos y neurotransmisores. Las GRKs y arrestinas controlan dicha señalización mediando la desensibilización de estos GPCR. Existen pruebas recientes que sugieren que la maquinaria de desensibilización GRK/ β -arrestina juega un papel vital en el desarrollo y progreso de varios trastornos inflamatorios agudos y crónicos (Vroon y col., 2006). En nuestro modelo animal de EAE-CR, hemos detectado un aumento de estrés oxidativo, alteraciones de las moléculas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ e infiltración de células inmunes en el hipocampo de las ratas. Por ello, con objeto de profundizar en esta patología inflamatoria, quisimos analizar la implicación del sistema GRK/ β -arrestina en la EAE-CR valorando los niveles de expresión de ambas proteínas, mediante western-blot, en las distintas fases de la enfermedad.

Entre las diferentes isoformas de GRK, evaluamos los niveles de GRK2, GRK5 y GRK6 dada su elevada expresión en el SNC (Penela y col., 2003). Los resultados de la **Figura 86** muestran que en las membranas de hipocampo de las ratas con EAE-CR, los niveles proteicos de GRK 2 y GRK 5 están disminuidos en el primer brote mientras que en el periodo entre brotes, se observa un aumento de los niveles de GRK 2 y una disminución de la misma en el segundo brote, así como un aumento de los niveles de GRK6 en comparación con las ratas control. Por otro lado, en membranas de hipocampo de ratas con EAE-CR+PEA, los valores de GRK fueron similares a los de las ratas control. Por el contrario, en las ratas control+PEA, se detecta una disminución de los niveles de GRK5 en el periodo entre brotes y un aumento de los niveles de GRK6 en el segundo brote.

Las GRK 2, 5 y 6 se translocan a la membrana plasmática desde el citosol con el fin de fosforilar al receptor en el extremo C-terminal y así, conducir a su desensibilización o internalización. El proceso de endocitosis del receptor fosforilado se produce a través de la unión de una segunda proteína, la β -arrestina, al mismo. En el presente estudio, detectamos modificaciones en los niveles proteicos de las GRKs tanto en las ratas con EAE-CR como en las ratas pretratadas con la sal de PEA (**Figura 86**),

por lo que el siguiente paso fue analizar si las alteraciones en los niveles proteicos de dichas quinasa se correspondían con alteraciones en los niveles proteicos de la β -arrestina. Para ello, medimos los niveles proteicos de β -arrestina en membrana y en la fracción citoplasmática del hipocampo.

Como puede observarse en la **Figura 87**, los niveles de β -arrestina 2 en membranas hipocámpales de ratas con EAE-CR están aumentados en el primer brote, en comparación con las ratas control. Este resultado se correlaciona con una pequeña disminución en los niveles de β -arrestina 2 en citoplasma (aunque no significativo) así como una disminución de los niveles proteicos de GRK 2 y GRK5 en membranas. En las ratas con EAE-CR+PEA, también se observa un aumento de los niveles de β -arrestina 2 en membrana y una ligera disminución de sus niveles en fracción citoplasmática en el primer brote de la enfermedad. En el periodo entre brotes, no se encuentran modificaciones de los niveles de β -arrestina 2 en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Por otro lado, en el segundo brote, se observa una disminución de los niveles de β -arrestina 2 en membranas de ratas con EAE-CR, correlacionado con un aumento significativo de los niveles proteicos de dicha proteína en la fracción citoplasmática. Sin embargo, en las ratas con EAE-CR+PEA, los niveles de dicha proteína se mantienen similares a los del grupo control.

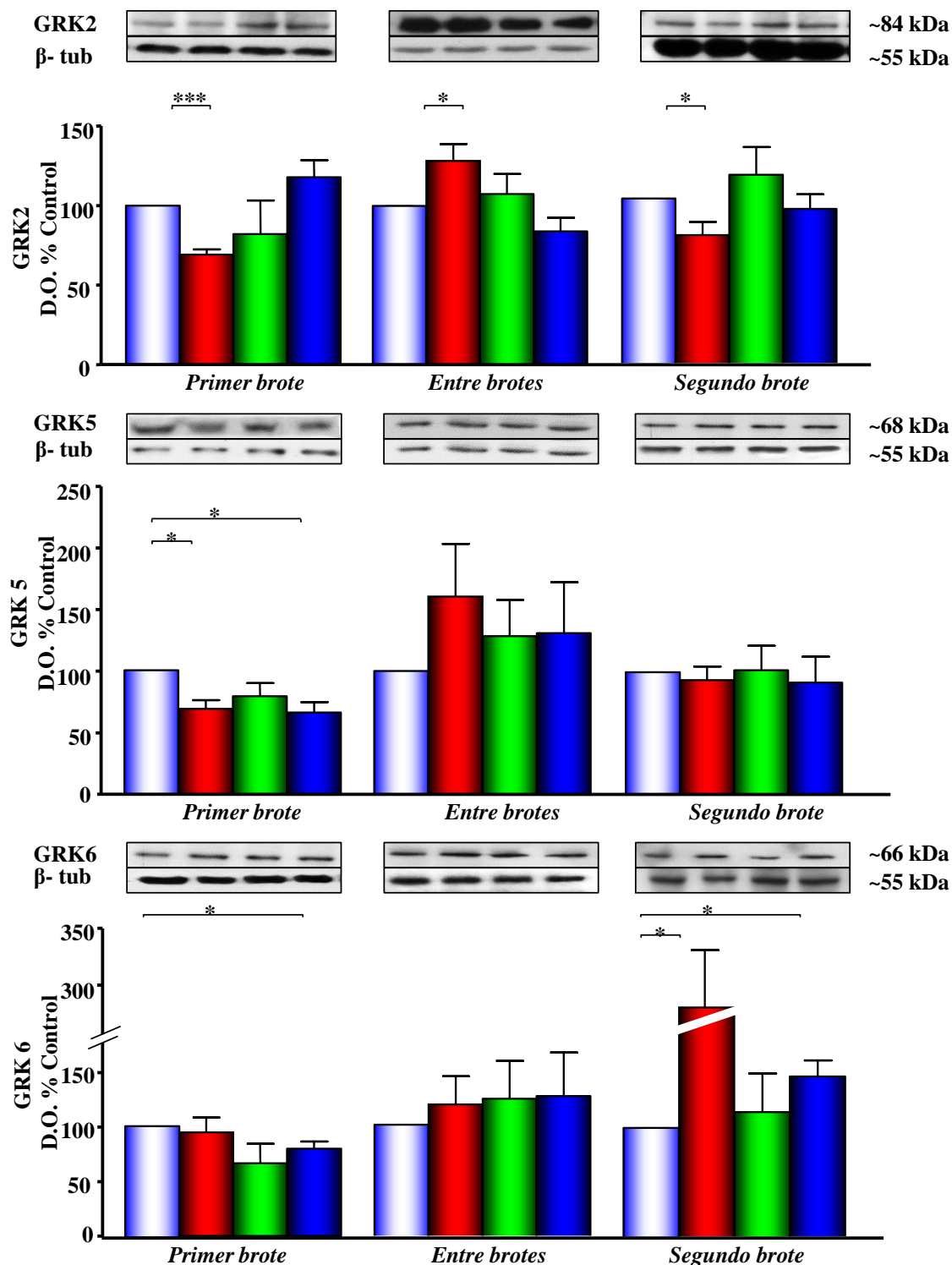


Figura 86: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de las GRK en membranas de hipocampo de ratas control (■), ratas con EAR-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó β -tubulina (β -tub), detectada con un anticuerpo monoclonal. Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, a cuya densidad óptica, una vez normalizada con β -tub, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

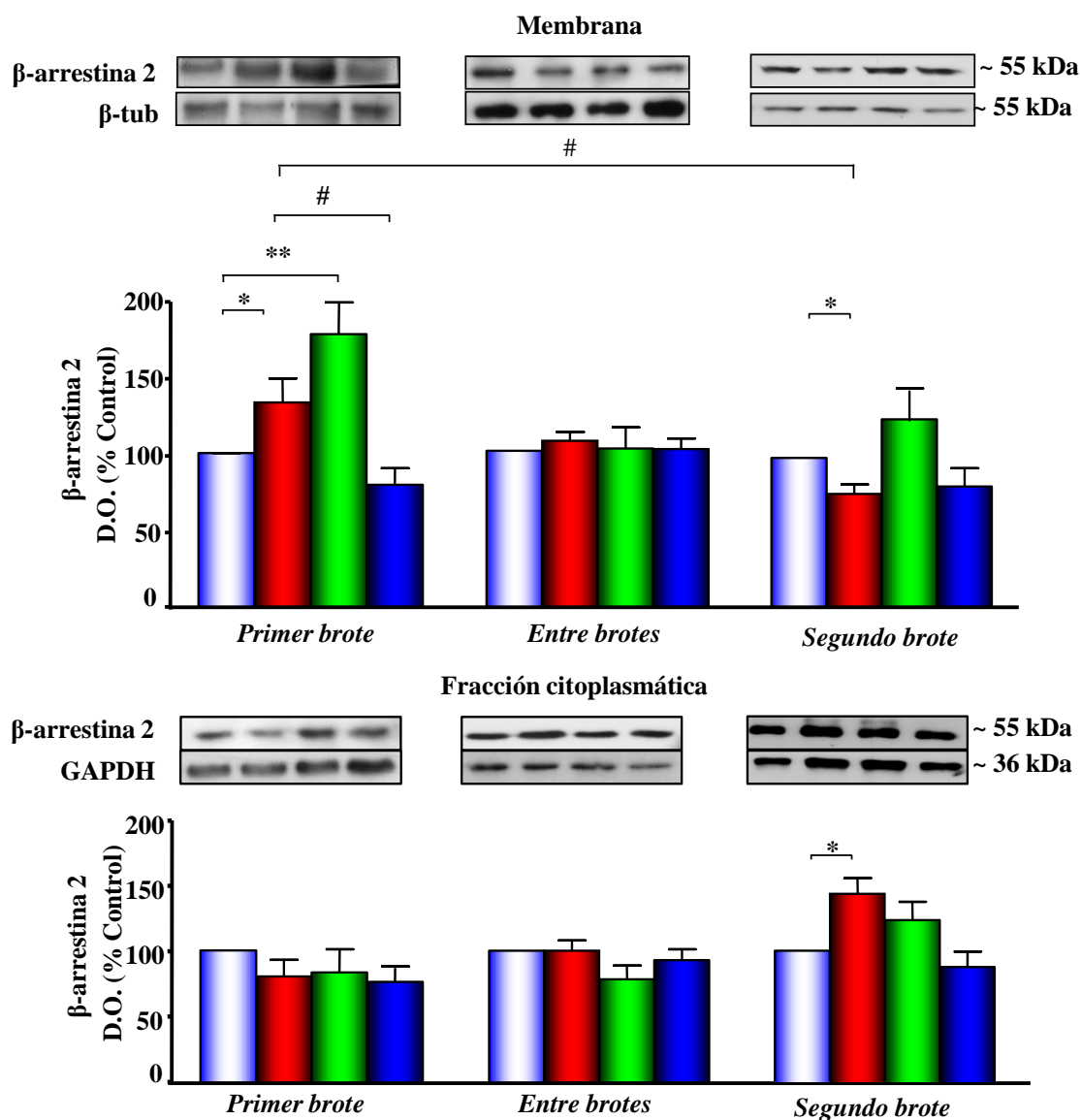


Figura 87: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de β -arrestina en membranas o en fracción citoplasmática de hipocampo de ratas control (■), ratas con EAE-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó β -tubulina (β -tub) y GAPDH, detectadas con anticuerpos monoclonales. Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, a cuya densidad óptica, una vez normalizada con β -tub o GAPDH, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: # $p < 0,05$.

F. ESTUDIO DEL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS CON EAE-CR Y EFECTO DE LA SAL DE PEA

Estudios muy recientes han demostrado una reducción significativa en los niveles de SST inmunoreactiva y una expresión aumentada de TNF- α en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM en comparación con individuos sanos (Basivireddy y col., 2013). Se sabe, además, que el sistema somatostatinérgico es capaz de modular el sistema inmunológico. Así, se ha demostrado que la SST inhibe la proliferación de linfocitos T y la secreción de ciertas citoquinas proinflamatorias mientras que en células B, es capaz de reducir la secreción de inmunoglobulinas (ten Bokum y col., 2000). Además de su implicación en procesos inflamatorios, se sabe que el sistema somatostatinérgico hipocampal participa en procesos de aprendizaje y memoria, los cuales están alterados en el 40-60% de pacientes con EM que han presentado un primer brote. Por todo ello, nos propusimos analizar la integridad del sistema receptor-efector de la SST en nuestro modelo crónico de EAE así como el efecto de la sal de PEA sobre el mismo en el hipocampo de las ratas. Con este fin, se midieron: los niveles de somatostatina inmunoreactiva (SST-IR) y la expresión proteica de dicho neurotransmisor los parámetros de unión de la SST a sus receptores, la expresión de dichos receptores, los niveles proteicos de las proteínas Gi y la funcionalidad y expresión del efector AC en membranas de hipocampo en los distintos grupos experimentales.

F.1. EXPRESIÓN DE LA SOMATOSTATINA

Para analizar el estado del sistema somatostatinérgico, evaluamos, en primer, lugar los niveles de SST-IR en extractos de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad.

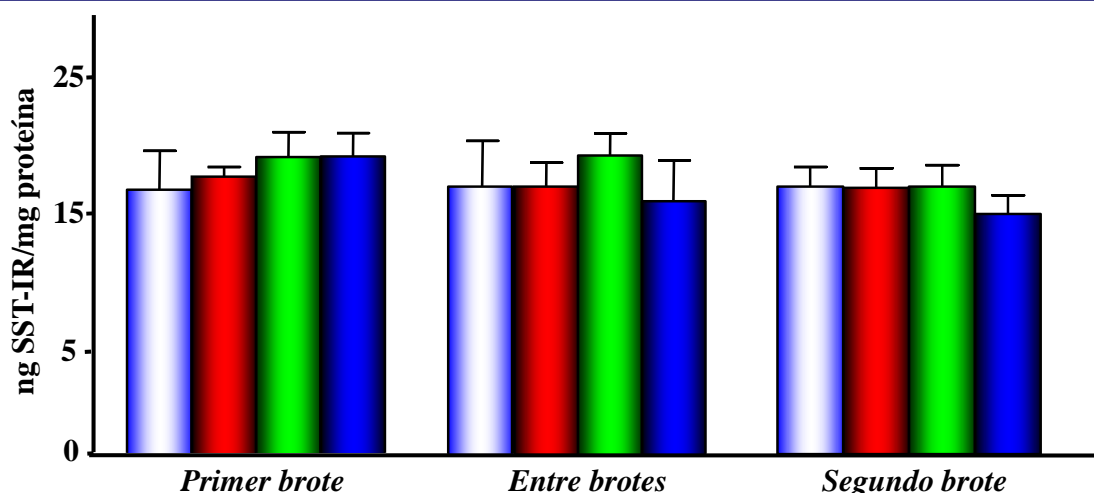


Figura 88: Niveles de somatostatina inmunoreactiva (SST-IR), determinada mediante radioinmunoanálisis (RIA), en el hipocampo de ratas control (■), ratas con EAR-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■), en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados se presentan como la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes realizados por duplicado.

Los resultados de la **Figura 88** no muestran cambios significativos en los niveles de SST-IR entre los grupos experimentales estudiados, en ninguno de los tres periodos de la enfermedad.

F.2. RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

F.2.1. Parámetros de unión de la somatostatina a sus receptores

El siguiente objetivo fue analizar, a lo largo de los tres periodos de la enfermedad, los parámetros de unión de la SST a sus receptores específicos de membrana, así como valorar el efecto de la sal de PEA en los mismos.

El análisis de la unión de la SST-14 a sus receptores se realizó mediante estudios de competición, donde la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SST-14 se desplaza con concentraciones crecientes de SST fría. Estudios preliminares con membranas de hipocampo revelaron que estos receptores unen la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SST-14 de forma dependiente del tiempo, alcanzando un equilibrio aparente a los 60 minutos, a 30°C, que permanece estable al menos durante 120 minutos. Por ello, los ensayos de unión se realizaron bajo estas condiciones.

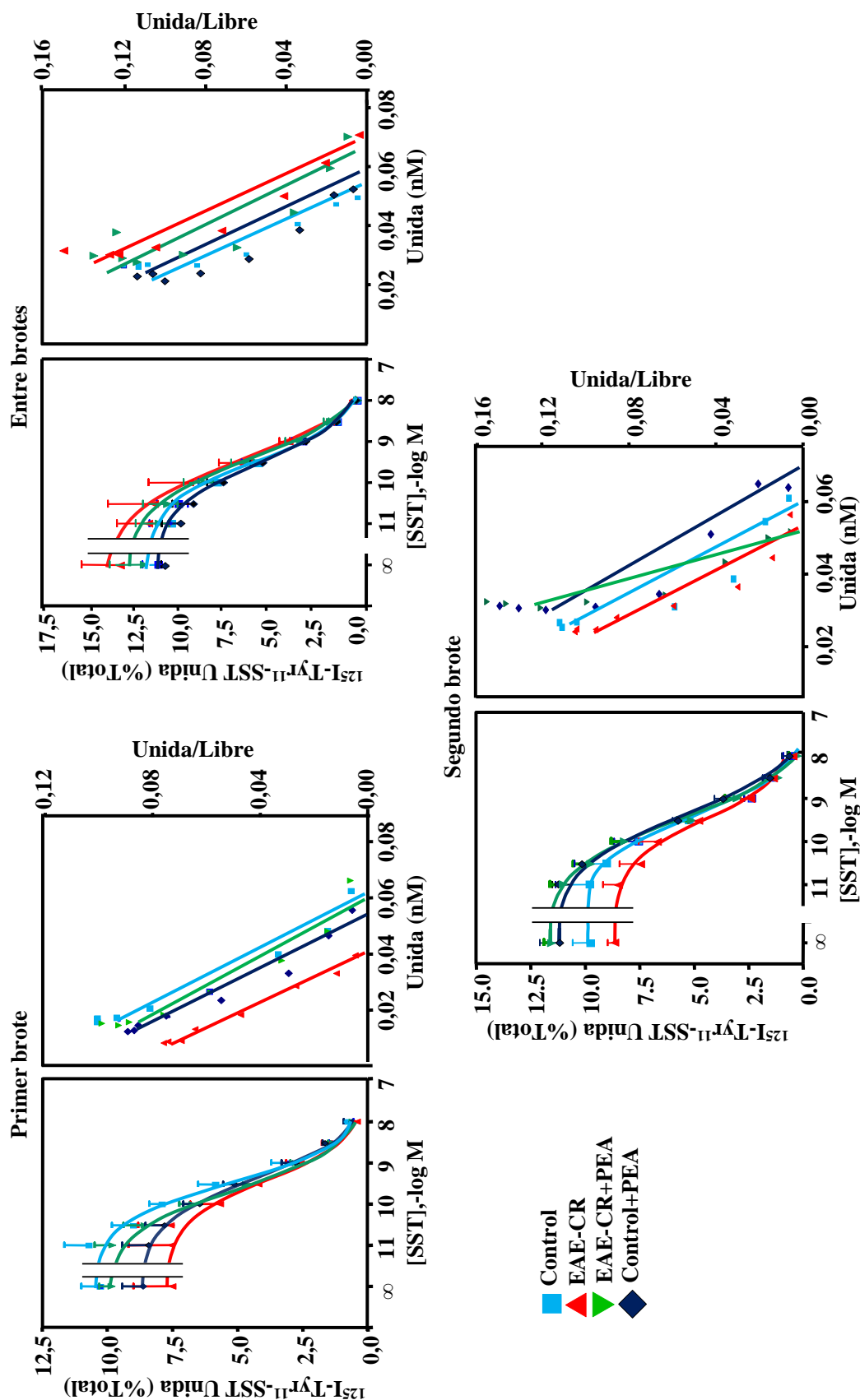


Figura 89: Unión de la somatostatina (SST) a sus receptores en los tres periodos de la enfermedad. Panel izquierdo: Inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$ a sus receptores en membranas de hipocampo de ratas por la SST fría. Panel derecho: Análisis de Scatchard de los datos de unión. Los correspondientes parámetros de equilibrio se muestran en la **Tabla 22.**

Tabla 22: Parámetros de equilibrio de la unión de la somatostatina (SST) a sus receptores en membranas de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA, en los tres periodos de la enfermedad: primer brote, entre brotes y segundo brote. Los parámetros de equilibrio se calcularon a partir del análisis de Scatchard por regresión lineal. Las unidades para la Kd son nM y para la Bmax son fentomoles de SST unida por mg de proteína. Los valores se expresan como la media \pm E.S.M de cinco experimentos realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$.

Grupos	Primer Brote		Entre brotes		Segundo brote	
	Receptores de SST		Receptores de SST		Receptores de SST	
	Bmax	Kd	Bmax	Kd	Bmax	Kd
Control	387,5 \pm 48,3	0,33 \pm 0,06	341,9 \pm 26,1	0,26 \pm 0,01	365,0 \pm 55,8	0,43 \pm 0,04
EAE-CR	272,7 \pm 25,6*	0,48 \pm 0,07	501,3 \pm 45,0*	0,32 \pm 0,04	237,5 \pm 16,4*	0,35 \pm 0,03
EAE-CR+PEA	395,3 \pm 14,7	0,51 \pm 0,07	482,9 \pm 78,8	0,52 \pm 0,08*	389,1 \pm 34,6	0,22 \pm 0,02*
Control+PEA	379,9 \pm 34,8	0,51 \pm 0,08	344,1 \pm 33,4	0,25 \pm 0,02	329,9 \pm 47,8	0,30 \pm 0,05

El análisis de Scatchard muestra modificaciones significativas en la unión de la SST a sus receptores en las ratas con EAE-CR en cada uno de los periodos de la enfermedad.

En el primer brote de ratas con EAE-CR, se observa un descenso en la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$ a sus receptores específicos en membranas de hipocampo, en comparación con las ratas control, mientras que el pretratamiento con PEA previene dicho descenso (**Figura 89** y **Tabla 22**).

El análisis de Scatchard reveló que dicha disminución se debe a un descenso en el número de receptores de SST. En el periodo entre brotes de ratas con EAE-CR, hay un aumento en la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SST-14}$ a sus receptores específicos en membranas de hipocampo, atribuible a un aumento en la densidad de los receptores de SST. Por otro lado, en ratas con EAE-CR+PEA la constante de disociación (Kd) aumenta en membranas de dicha área cerebral. En el segundo brote, se vuelve a observar una disminución en la unión específica del trazador a los SSTTR en las ratas con EAE-CR con respecto al grupo control, similar a lo que sucede en el primer brote de la enfermedad mientras que en las ratas con EAE-CR+PEA, el número de receptores de

SST se mantiene constante, aunque se observa una disminución en la Kd. Por otro lado, el tratamiento de las ratas control con PEA no provocó modificación en el número de receptores en los tres periodos de la enfermedad, aunque si modificó la afinidad de los receptores al trazador en el periodo entre brotes y en el segundo brote.

F.2.2. Expresión de los receptores de somatostatina

Dado que existen cinco subtipos de SSTR en el hipocampo de rata y a la vista de los cambios descritos anteriormente, quisimos valorar los niveles de expresión de aquellos SSTR que presentan mayor afinidad por el péptido endógeno SST-14. Por ello, se determinaron los niveles proteicos de los receptores SSTR1, SSTR2, SSTR3 y SSTR4 mediante western-blot en los tres periodos de la enfermedad, así como el efecto del PEA en dichos niveles.

Los resultados de la **Figura 91** muestran que en el primer brote de la EAE-CR, existe una disminución en los niveles proteicos de SSTR3 en el hipocampo. Sin embargo, no se detectaron cambios en dicho subtipo en las ratas con EAE-CR+PEA en comparación con las ratas control. Esta disminución del SSTR3 podría explicar, al menos en parte, la disminución de la unión del trazador al receptor (**Figura 89** y **Tabla 22**). En el periodo entre brotes, los niveles proteicos de SSTR1, SSTR2 y SSTR4 están aumentados en las ratas con EAE-CR, mientras que en las ratas con EAE-CR+PEA y en las ratas control+PEA, se encuentra un aumento de los niveles proteicos del SSTR4, sin cambios en el resto de los subtipos (**Figura 90** y **Figura 91**). Estos datos se correlacionan con el aumento de la B max descrito anteriormente (**Figura 89** y **Tabla 22**). En el segundo brote de ratas con EAE-CR, se observa una disminución de los niveles proteicos del subtipo SSTR3, similar al primer brote, mientras que las ratas con EAE-CR+PEA muestran un aumento en los niveles proteicos del SSTR1.

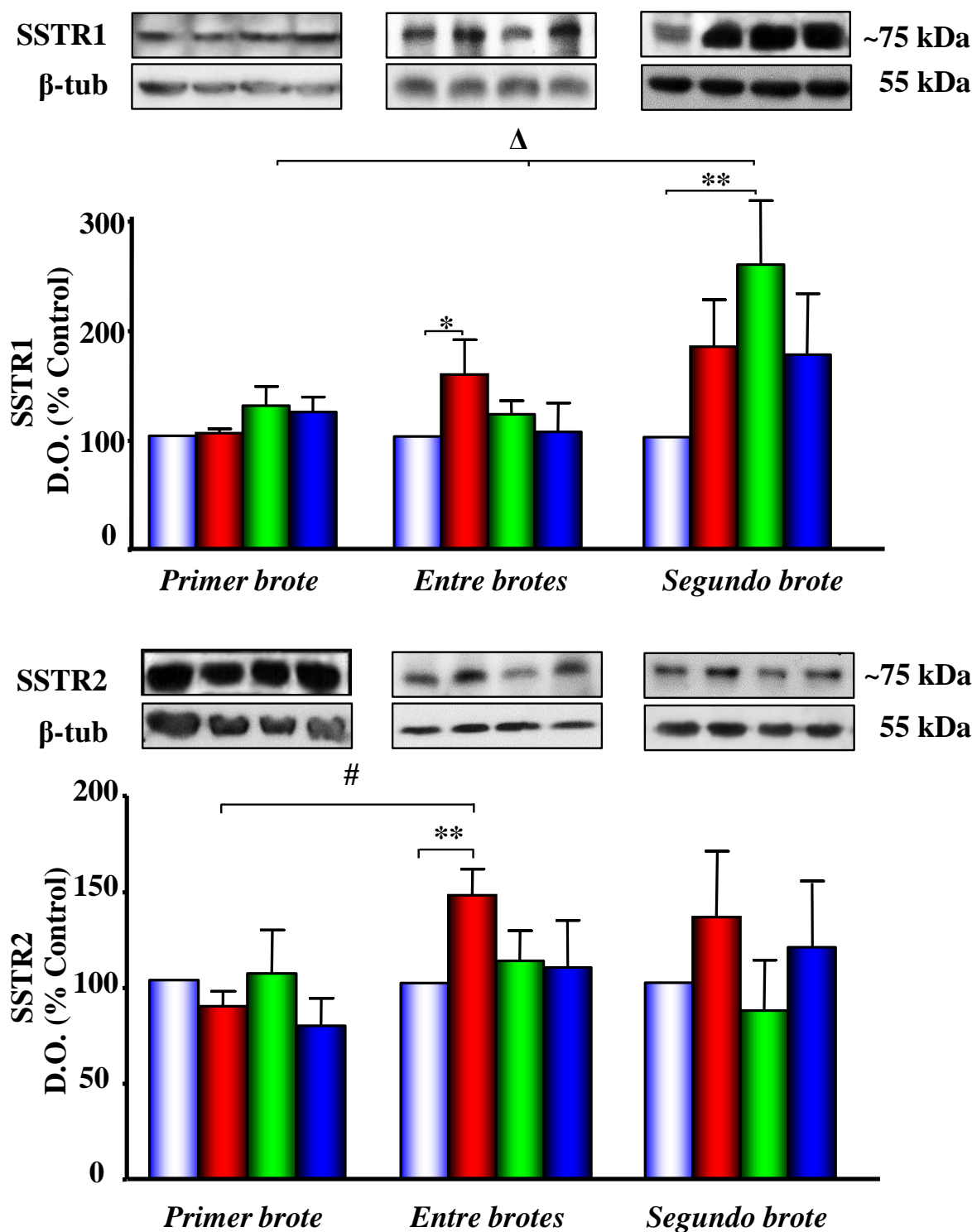


Figura 90: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los receptores de somatostatina SSTR1 y SSTR2 presentes en el hipocampo de ratas control (■), ratas con EAR-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó β -tubulina (β -tub), detectada con un anticuerpo monoclonal. Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, a cuya densidad óptica, una vez normalizada con β -tub, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

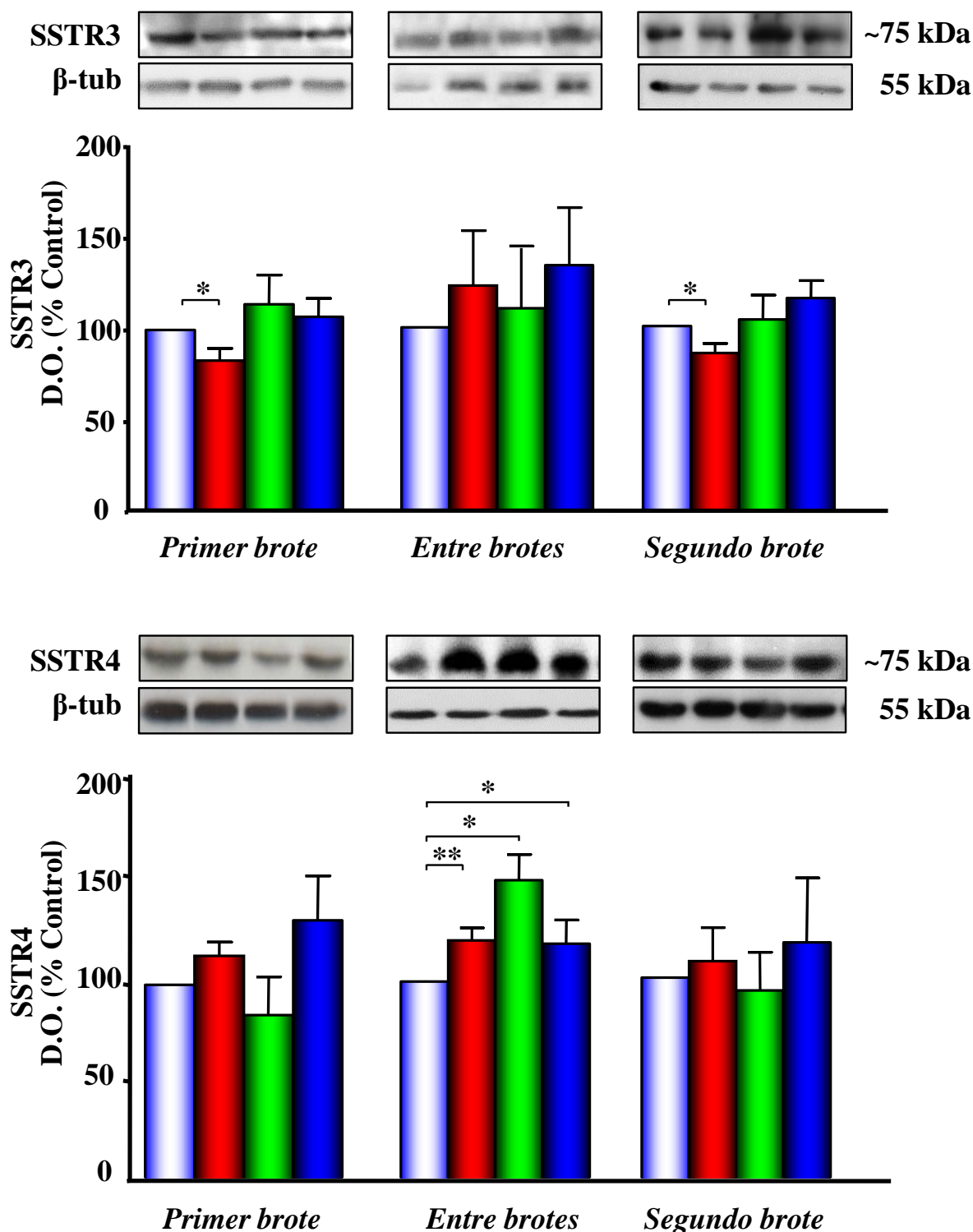
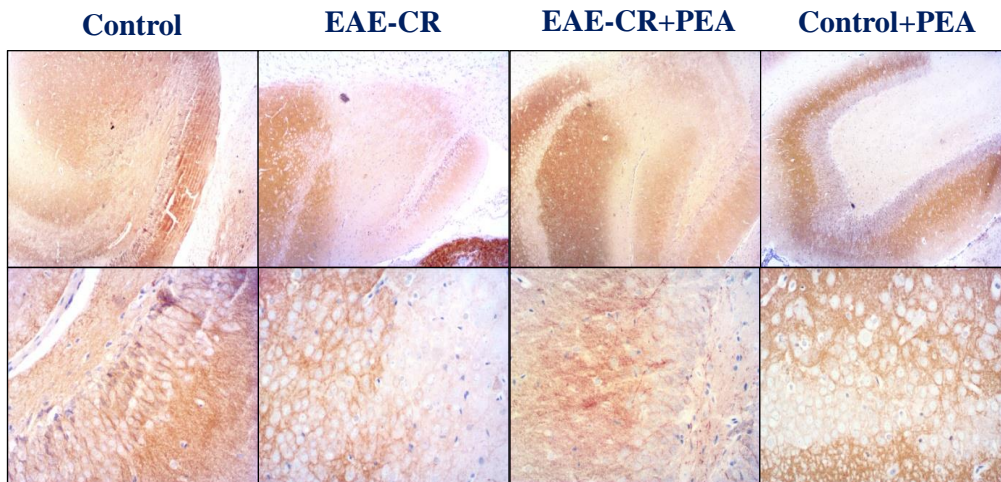


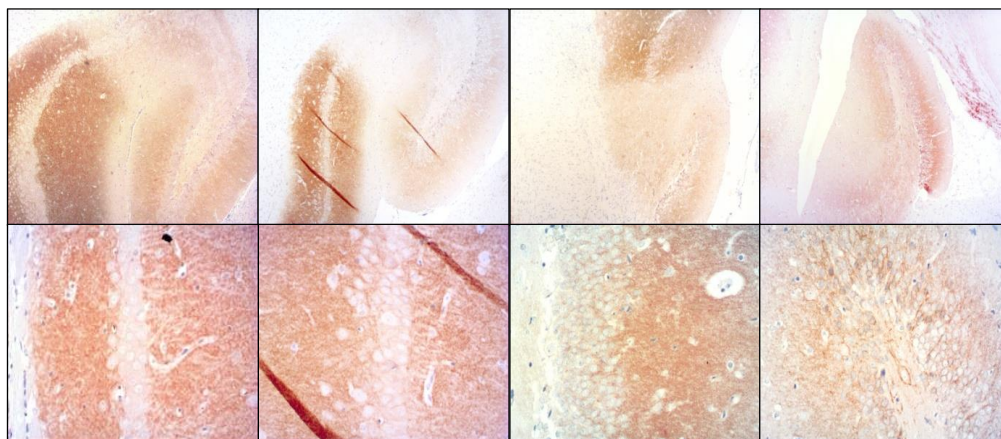
Figura 91: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los receptores de somatostatina SSTR3 y SSTR4 presentes en el hipocampo de ratas control (■), ratas con EAR-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó β-tubulina (β-tub), detectada con un anticuerpo monoclonal. Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, a cuya densidad óptica, una vez normalizada con β-tub, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media ± E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: *p<0,05, **p<0,01.

SSTR2 EN EL HIPOCAMPO

1^{er} BROTE



ENTRE BROTES



2^o BROTE

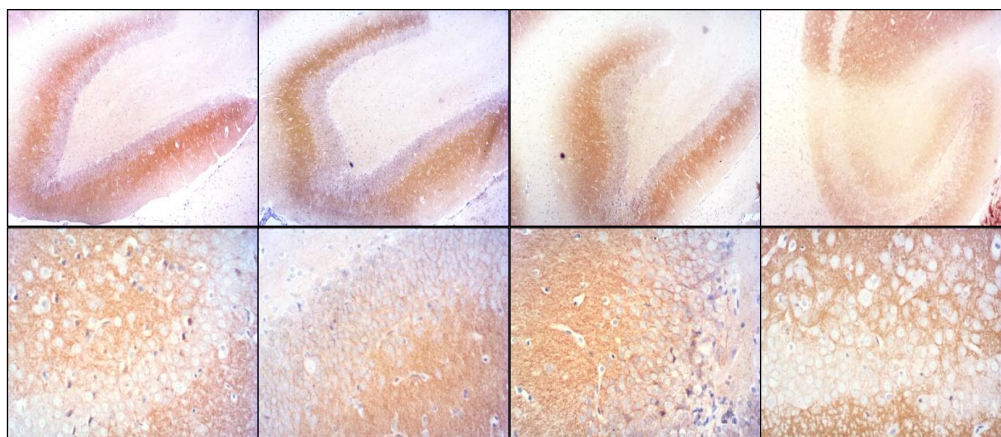


Figura 92: Estudio histológico del subtipo SSTR2 en hipocampo de rata. En la figura, se muestran las fotografías de 200 aumentos (paneles superiores) y de 400 aumentos (paneles inferiores) del hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA en los tres periodos de la enfermedad, representativas de cinco experimentos independientes, realizados cada uno por duplicado.

Los resultados obtenidos por western-blot en membranas hipocampales de las ratas con EAE-CR no muestran diferencias significativas en los niveles proteicos de SSTR1, SSTR2 y SSTR4 con respecto al control, mientras que los niveles del están disminuidos tanto en el primer brote como en el segundo brote. Estos resultados no explican, del todo, los niveles tan bajos de Bmax obtenidos en la técnica de unión de la SST a sus receptores. Con objeto de profundizar más en estas alteraciones, evaluamos los niveles de SSTR2 en el hipocampo de rata por inmunohistoquímica en los tres periodos de la enfermedad. Los resultados de la **Figura 92** muestran que los niveles de SSTR2 en las ratas con EAE-CR, tanto en el primer brote como en el periodo entre brotes, tienden a disminuir en las zonas del hilus y en la capa granular del hipocampo, mientras que aumentan en la zona de la comisura hipocampal, en comparación con las ratas control. En el segundo brote, hay una disminución del SSTR2 en el estrato molecular y en la zona del hilus del hipocampo, aunque se aprecia un aumento en sus niveles en el estrato radial del hipocampo, al compararlos con las ratas control. Estos resultados muestran, en su conjunto, que en las ratas con EAE-CR, existen áreas del hipocampo con una disminución del SSTR2 y áreas con un aumento de dichos niveles. Sin embargo, en las ratas con EAE-CR+PEA así como en las ratas control+PEA, se observa un patrón de distribución del SSTR2 y niveles de dicho receptor similares a los de las ratas control.

F.3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA

F.3.1. Funcionalidad de la adenilato ciclasa

Como se ha explicado en el apartado de introducción, los SSTRs se acoplan a diferentes efectores, entre ellos, a la enzima AC, a través de proteínas Gi. Por ello, el siguiente paso fue comprobar la actividad de la AC en la EAE-CR en los tres periodos de la enfermedad, así como el efecto de la sal de PEA en esta vía de señalización.

Los resultados de la **Tabla 23** muestran que en membranas hipocampales de las ratas con EAE-CR, en el primer brote, la actividad AC basal e inhibida por SST están disminuidas. Por otro lado, en las membranas de ratas con EAE-CR+PEA, se mantienen los valores de actividad de la AC similares a los valores control. En el periodo entre brotes, no se detectan modificaciones en dicha actividad en ninguno de los grupos experimentales estudiados. En membranas hipocampales procedentes de las ratas con

EAE-CR en el segundo brote, se detecta una disminución en la actividad AC basal y estimulada por forskolina (FK) así como una disminución en el efecto inhibitorio de la SST sobre dichas actividades. Sin embargo, la sal de PEA mantiene dichos parámetros similares a los valores del grupo control, a excepción de la actividad estimulada por FK e inhibida por SST (**Tabla 23**).

F.3.2. Expresión de la adenilato ciclasa

A la vista de los resultados anteriores, nos planteamos si la disminución en la actividad AC basal en el primer y segundo brote de la enfermedad, se correspondía con una disminución en los niveles proteicos de algunas isoformas de la AC. Para evaluarlo, se analizaron los niveles proteicos de la ACI y ACVIII, al ser éstas las isoformas mayoritarias en el cerebro (Sunahara y Taussing, 2002), así como la ACV/VI, dos isoformas que se inhiben por proteínas Gai (**Figura 93**). Los resultados muestran que los niveles proteicos de la ACI, tanto en el primer como en el segundo brote de ratas con EAE-CR, están disminuidos en comparación con los valores control. Estos resultados podrían explicar la disminución de la actividad AC observado en los experimentos anteriores (**Tabla 23**). En el periodo entre brotes de dichas ratas, los niveles de ACI son similares a los de las ratas control y, por lo tanto, mayores que en el primer y segundo brote. Sin embargo, en las ratas EAE-CR+PEA, no hay diferencias significativas en los niveles de ACI en comparación con el grupo control, en el primer o segundo brote de la enfermedad, aunque en el periodo entre brotes se observa un aumento de dichos niveles. En las ratas con EAE-CR, los niveles proteicos de la ACV/VI también están disminuidos en el primer brote en comparación con los valores control, un efecto que no se observa en el segundo brote mientras que los niveles proteicos de la isoforma ACVIII están disminuido en ambos brotes. En el periodo entre brotes, sin embargo, se observa un aumento de dichos niveles en comparación con los del primer brote y segundo brote. En las ratas EAE-CR+PEA, sólo se detecta una disminución de la ACVIII en el segundo brote.

Tabla 23: Efecto de la somatostatina (SST, 10^{-4} M) y de la forskolina (FK, 10^{-5}) sobre la actividad adenilato ciclasa (AC) en membranas de hipocampo de ratas control, ratas con EAE-CR, ratas con EAE-CR+PEA y ratas control+PEA. Los valores representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos individuales realizados por duplicado. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Comparación estadística respecto al grupo EAE-CR: # $p < 0,05$.

<i>Primer brote</i>	<i>Control</i>	<i>EAE-CR</i>	<i>EAE-CR+PEA</i>	<i>Control+PEA</i>
Actividad Basal	766,9 \pm 33,3	560,3 \pm 45,4*	822,1 \pm 72,7#	723,7 \pm 81,6
+ 10^{-4} M SST	675,8 \pm 20,3	375,5 \pm 66,4*	678,7 \pm 95,5#	543,4 \pm 91,2
+ 10^{-5} M FK	3494,1 \pm 305,8	2871,0 \pm 171,7*	3457,1 \pm 211,2	2757,1 \pm 191,3
+ 10^{-5} M FK + 10^{-4} M SST	2487,0 \pm 190,4	2441,2 \pm 170,5	2726,1 \pm 469,8	2313,0 \pm 678,9
% Inhibición por SST de la actividad basal	37,5 \pm 9,3	18,2 \pm 2,4*	28,7 \pm 7,3	24,9 \pm 7,9
% Inhibición por SST de la actividad estimulada por FK	32,3 \pm 9,7	14,6 \pm 8,1*	21,1 \pm 9,5	25,7 \pm 10,4

<i>Entre brotes</i>	<i>Control</i>	<i>EAE-CR</i>	<i>EAE-CR+PEA</i>	<i>Control+PEA</i>
Actividad Basal	765,4 \pm 73,9	761,1 \pm 112,5	721,4 \pm 136,9	849,0 \pm 95,9
+ 10^{-4} M SST	514,1 \pm 52,1	584,1 \pm 89,7	516,9 \pm 86,1	576,2 \pm 72,7
+ 10^{-5} M FK	2778,1 \pm 309,1	2988,0 \pm 361,4	2856,3 \pm 573,7	3667,1 \pm 348,9
+ 10^{-5} M FK + 10^{-4} M SST	2264,0 \pm 314,8	2336,9 \pm 135	2558,9 \pm 559,5	2720,2 \pm 251,7
% Inhibición por SST de la actividad basal	110,5 \pm 19,6	83,1 \pm 20,9	93,8 \pm 7,1	109,9 \pm 19,1
% Inhibición por SST de la actividad estimulada por FK	69,5 \pm 22,4	120,6 \pm 30,1	78,3 \pm 13,4	86,8 \pm 21,1

<i>Segundo brote</i>	<i>Control</i>	<i>EAE-CR</i>	<i>EAE-CR+PEA</i>	<i>Control+PEA</i>
Actividad Basal	757,5 \pm 96,9	336,7 \pm 139,4*	713,2 \pm 143,1	601,8 \pm 82,3
+ 10^{-4} M SST	448,8 \pm 75,6	229,5 \pm 52,5*	416,3 \pm 175,3	348,1 \pm 84,6
+ 10^{-5} M FK	2722,6 \pm 841,3	1676,3 \pm 331,1*	2245,7 \pm 690,8	2198,0 \pm 735,2
+ 10^{-5} M FK + 10^{-4} M SST	2075,1 \pm 126,7	1236,8 \pm 301,9*	1450,5 \pm 164,2**	1550,7 \pm 277,1*
% Inhibición por SST de la actividad basal	48,8 \pm 7,9	25,6 \pm 8,5*	40,6 \pm 9,3	45,2 \pm 26,4
% Inhibición por SST de la actividad estimulada por FK	41,2 \pm 7,0	25,7 \pm 8,4*	31,5 \pm 5,7	32,8 \pm 9,9

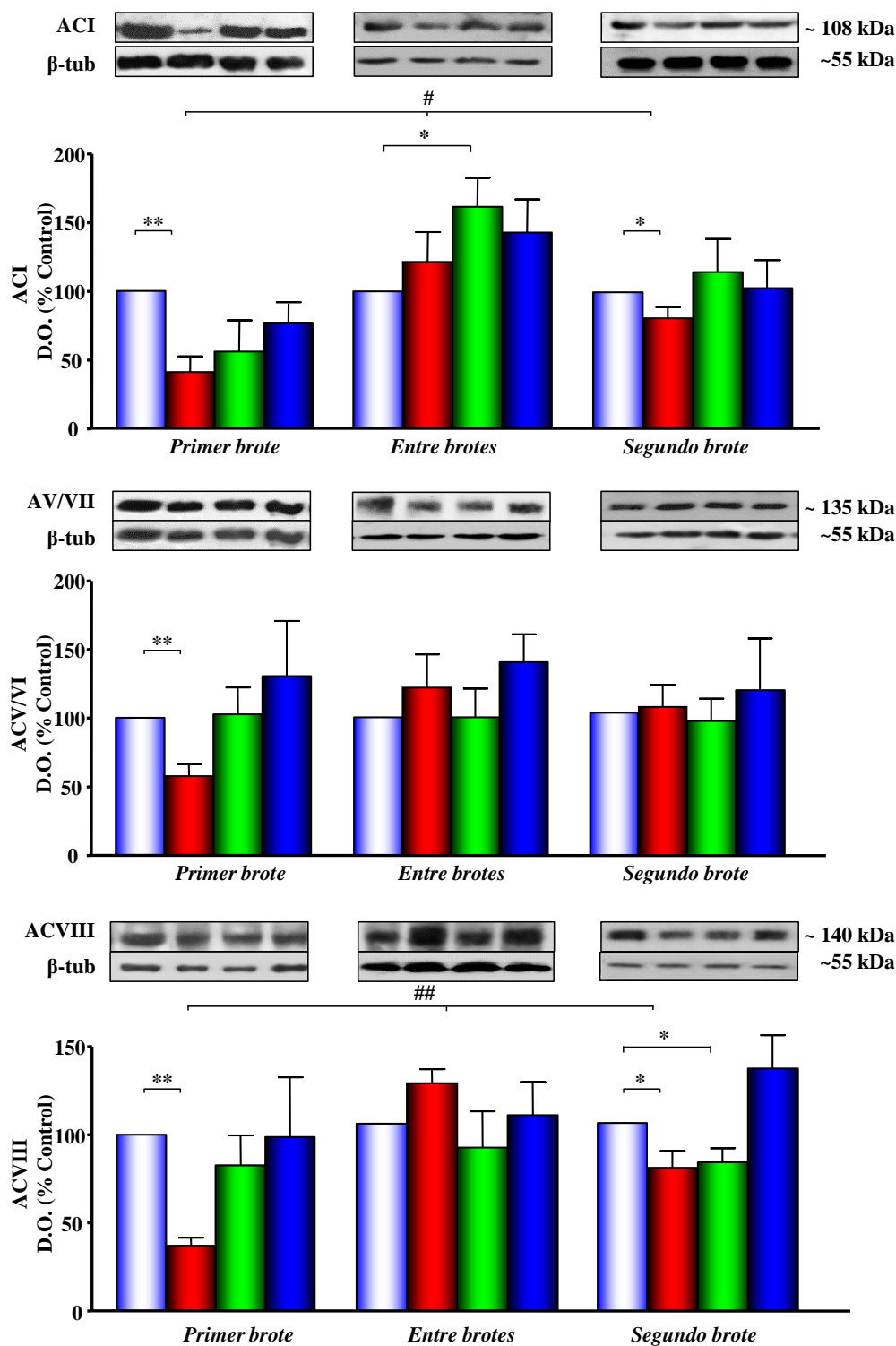


Figura 93: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de las distintas isoformas de la AC de ratas control (■), ratas con EAE-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó β-tubulina (β-tub). Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, cuya densidad óptica, una vez normalizada con β-tub, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media ± E.S.M. de cinco experimentos independientes por duplicado. Comparación estadística frente al control: *p<0,05; **p<0,01. Comparación estadística frente al grupo EAE-CR: #p<0,05; ##p<0,01

F.4. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS Gi

Los SSTRs se acoplan de manera negativa a la AC a través de las subunidades α_i (α_{i1} , α_{i2} , α_{i3}) de las proteínas Gi. La disminución de los niveles proteicos de las isoformas ACI, ACV/VI y ACVIII en las ratas con EAE-CR detectada en el primer brote podría explicar, al menos en parte, la disminución de la actividad AC en dichas ratas. En el segundo brote, no obstante, la disminución de la actividad AC no se correlaciona con una disminución de los niveles proteicos de AC, por lo que el siguiente paso fue evaluar la expresión de las proteínas Gi. Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura 94**. Así, los niveles proteicos de las proteínas Gi α_1 en las ratas con EAE-CR están significativamente disminuidos en comparación con los del grupo control, tanto en el primer brote como en el segundo, mientras que en el periodo entre brotes, se observa un aumento de dichos niveles. Por otro lado, en las ratas con EAE-CR+PEA, los niveles proteicos de Gi α_1 también disminuyen, tanto en el primer brote como en el segundo. En las ratas con EAE-CR, los niveles proteicos de la Gi α_2 están aumentados tanto en el primer como en el segundo brote mientras que en las ratas con EAE-CR+PEA no se observan diferencias significativas en ninguno de los tres brotes. Los niveles proteicos de Gi α_3 en las ratas con EAE-CR se encuentran disminuidos tanto en el primer brote como en el periodo entre brotes, mientras que en EAE-CR+PEA los niveles de Gi α_3 solo están disminuidos significativamente en el primer brote.

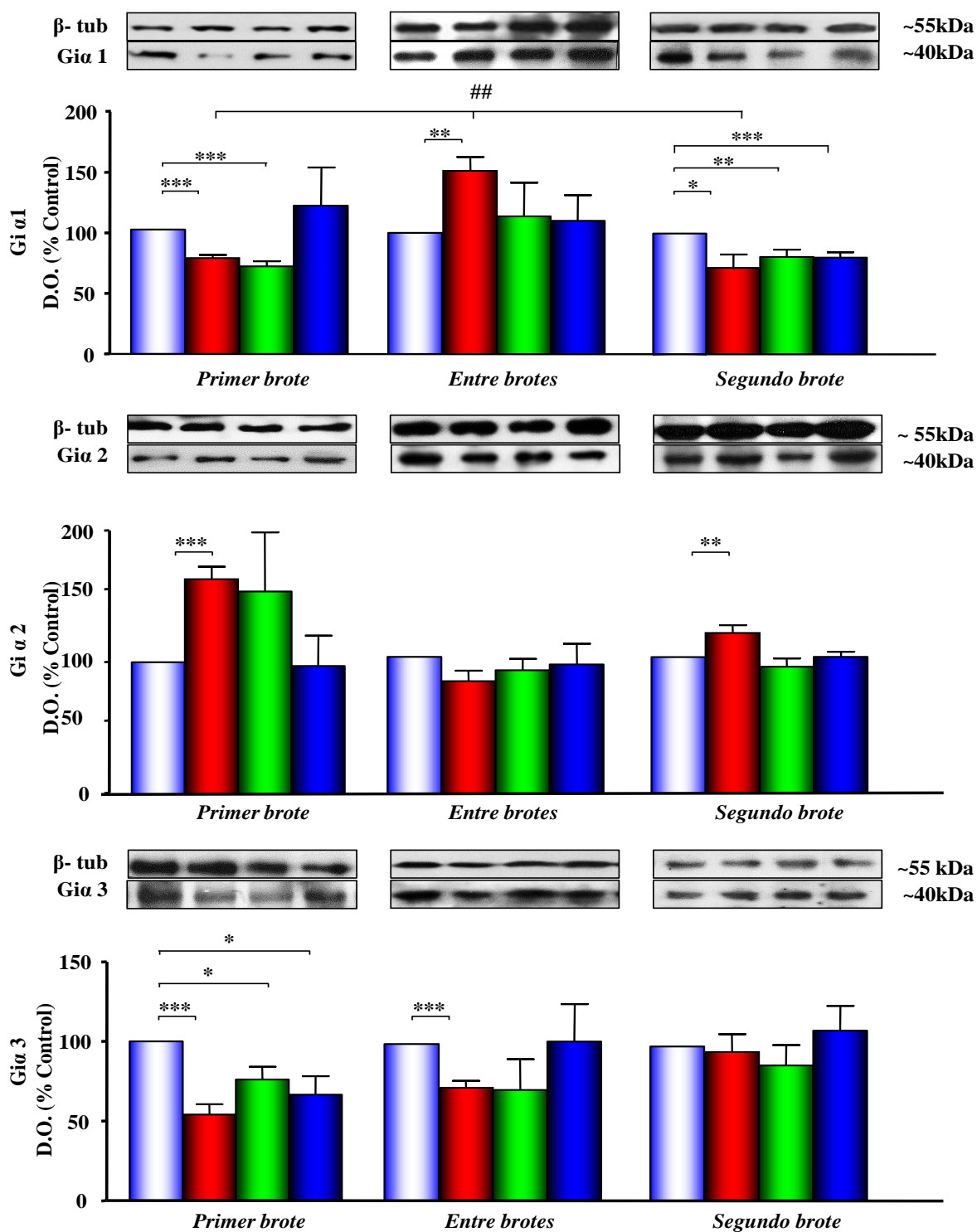


Figura 94: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de las proteínas Gi de ratas control (■), ratas con EAR-CR (■), ratas con EAE-CR+PEA (■) y ratas control+PEA (■) en los tres periodos de la enfermedad. Como control de carga, se utilizó β -tubulina (β -tub) detectada con un anticuerpo monoclonal. Las densidades ópticas se presentan como porcentaje del control, a cuya densidad óptica, una vez normalizada con β -tub, se le asignó un valor de 100%. Los datos representan la media \pm E.S.M. de cinco experimentos independientes. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Comparación estadística frente al enfermo: ## $p < 0,01$.

***D**iscusión*

“Ciencia es aquello sobre lo cual cabe siempre discusión”
[José Ortega y Gasset]

DISCUSIÓN:

La EM es la enfermedad crónica desmielinizante más común del SNC y representa la causa más frecuente de invalidez en el adulto joven. El estudio de sus alteraciones, así como la búsqueda de una terapia adecuada, se basan en la utilización de modelos animales que presenten alteraciones clínicas y anatomopatológicas similares a la EM.

En el presente trabajo, se estudió el sistema inmune, el estrés oxidativo y un sistema de neurotransmisión en un modelo animal de EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante (EAE-CR), dada su semejanza a la forma recurrente-remitente de la EM, que es una de las más frecuentes. Además, se evaluó el posible efecto preventivo o terapéutico de una sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina (PEA).

En el momento actual, no se conoce bien el antígeno que desencadena la activación de la respuesta inmune contra el SNC, aunque en el parénquima cerebral de pacientes con EM, se han encontrado linfocitos T autorreactivos frente a la proteína básica de mielina (PBM), la membrana de oligodendrocitos (MOG) y la proteína proteolípídica (PLP) (Martin y col., 1990, Ota y col., 1990, Elong Ngono y col., 2012). Por ello, para la realización de este estudio, se optó por utilizar el método descrito por Feurer en el que se inmunizan ratas Lewis hembras de 5 semanas de edad con un homogenado de médula espinal de cobaya (Feurer y col., 1985). La utilización de dicho homogenado es uno de los métodos más apropiados, ya que contiene todos los péptidos potencialmente encefalitogénicos, permitiendo así evaluar el curso crónico de la enfermedad en tres periodos: primer brote, periodo entre brotes y segundo brote. Este modelo experimental también permite evaluar el efecto de distintas terapias como el de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina, objeto de nuestro estudio.

Nuestros resultados muestran que todas las ratas inmunizadas con el homogenado de médula espinal de cobaya (ratas con EAE-CR) desarrollan la forma crónica de la enfermedad y, además, el 96,5% de los casos alcanzan el mayor grado de severidad clínica en el primer brote (grado 3). En el caso de las ratas con EAE-CR y pretratadas con la sal de PEA, los resultados muestran un retraso en la aparición de los signos clínicos, una reducción en la duración de los brotes, así como una menor

severidad de los mismos. Estos datos muestran que las manifestaciones clínicas de la enfermedad son más leves en las ratas con EAE-CR+PEA que en las ratas con EAE-CR.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran, por primera vez, que en este modelo animal realizado con médula espinal de cobaya, existen alteraciones en áreas cerebrales dedicadas al control del movimiento, como es el cerebelo, así como en áreas relacionadas con procesos cognitivos, como son el hipocampo y los cuerpos mamilares. Además, en el hipocampo de ratas con EAE-CR, se han detectado infiltrados inflamatorios, modificaciones en los niveles proteicos y en las actividades de enzimas antioxidantes y alteraciones funcionales del sistema somatostatinérgico. El tratamiento de dichas ratas con la sal de PEA previene o atenúa estas alteraciones.

La evolución del peso es uno de los parámetros utilizados para analizar el curso de la enfermedad. Las ratas con EAE-CR presentan una disminución del peso corporal que coincide con una disminución en la ingesta. Ambos parámetros vuelven a los valores control en el periodo entre brotes y disminuyen ligeramente en el segundo brote. Estos resultados coinciden con la evolución del curso clínico en modelos de EM en ratón descritos por Pollak y colaboradores (2000), quienes también observaron que el consumo de agua se mantenía constante mientras que el consumo de agua azucarada disminuía (Pollak y col., 2000). Esta disminución del peso corporal se podría explicar, por un lado, por la disminución de la ingesta, que podría atribuirse a alteraciones en los centros de saciedad localizados en el hipotálamo, ya que otros autores han encontrado alteraciones a ese nivel (Ruocco y col., 2004). Por otro lado, se podría relacionar con alteraciones a nivel intestinal dado que, recientemente, se ha descrito que ratones con EAE presentan úlceras intestinales y modificaciones en la flora intestinal (Koya y col., 2012). Las alteraciones de la flora intestinal podrían impedir una correcta digestión y absorción de nutrientes y, así, contribuir a la disminución del peso.

En las ratas con EAE-CR+PEA, observamos una menor disminución del peso corporal y de la ingesta en comparación con las ratas con EAE-CR. Además, las ratas del grupo control+PEA presentan un ligero aumento de dichos parámetros con respecto a las ratas control. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que la sal de PEA es un precursor de endocannabinoides, los cuales modulan la tasa de ingesta (Cota y col., 2003, Engeli, 2012). En este sentido, estudios de administración de

anandamida a nivel cerebral han demostrado que ésta estimula el apetito en las ratas a través de los receptores de endocannabinoides CB1 (Jamshidi y Taylor, 2001, Engeli y col., 2005, Viveros y col., 2008). Por ello, la inhibición de los receptores CB1 está siendo estudiado como un posible tratamiento para la obesidad (Scopinho y col., 2011, Engeli, 2012).

La etiología y la patogenia precisas de la EM se desconocen, aunque hay evidencias que sugieren dos fases diferenciadas, una fase inflamatoria y otra degenerativa progresiva. La fase inflamatoria es un proceso autoinmune producido tanto por las células inmunes como por anticuerpos. Tras activarse las células inmunes en la periferia (Sospedra y Martin, 2005), entran en el parénquima cerebral y producen daño en oligodendrocitos, neuronas y desmielinización axonal (McLaughlin y Wucherpfennig, 2008, Goverman, 2009, Ayoub y col., 2011). Entre los diferentes tipos celulares que intervienen en esta patología, las células T son las mejor estudiadas (McFarland y Martin, 2007).

Este trabajo demuestra que en este modelo animal de EAE-CR, existen modificaciones en las poblaciones linfocitarias de sangre periférica, bazo y parénquima cerebral, en los tres periodos de la enfermedad (**Figura 95**). Asimismo, hemos demostrado que la sal de PEA es capaz de mantener, al menos en parte, los niveles de las poblaciones celulares del sistema inmune en valores similares a los valores control (**Figura 95**).

Nuestros resultados en las ratas con EAE-CR muestran, en los tres periodos de la enfermedad, una disminución del porcentaje de células $CD3^+$ y un aumento de células B y NK en sangre periférica. En el bazo, se observa un aumento del porcentaje de células NK y una disminución de los niveles de NKT en los tres periodos estudiados. Además, entre la población de células T, observamos un incremento del porcentaje de células $CD4^+$ y una disminución de las células $CD8^+$. Estos resultados coinciden con los estudios realizados en modelos de EAE aguda en los que se cree que las células $CD4^+$ específicas para antígenos de mielina son las que desencadenan la enfermedad (Ben-Nun y Cohen, 1981, Karpus y Swanborg, 1991, Miller y col., 1995, Miller y col., 2010). Por otro lado, detectamos un aumento de los niveles de células B, lo que coincide con las observaciones de otros investigadores que sugieren que las células B y los anticuerpos que generan son fundamentales en la patogenia de la EAE (Lyons y col.,

2002). En este sentido, Vilcaes y col. (2005) observaron la presencia de anticuerpos IgG contra la mielina en modelos de EAE inmunizados con MOG (Raine y col., 1999, Vilcaes y col., 2005). Asimismo, los pacientes con EM presentan elevadas concentraciones séricas de anticuerpos IgG con actividad proteolítica contra la mielina (Ponomarenko y col., 2006a, Ponomarenko y col., 2006b). Por ello, nuevas estrategias terapéuticas se enfocan a modular este tipo celular (Prineas y Graham, 1981, Liossis y Sfrikakis, 2008, McLaughlin y Wucherpfennig, 2008, Reindl y col., 2010, Ray y col., 2011, Barr y col., 2012, Disanto y col., 2012, Niino y col., 2012)

Las ratas con EAE-CR, presentan un aumento de las células NK tanto en sangre periférica como en bazo, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores en ratas Agutí (Ringheim y col., 2013). Sin embargo, el papel que juegan las células NK en la EM y en la EAE no está claro. Hay autores que les atribuyen un papel beneficioso controlando y modulando el sistema inmune, mientras que otros les consideran participantes activos en los brotes agudos de la enfermedad (Pierson y col., 1995, Baxter y Smyth, 2002, Gandhi y col., 2010, Sakuishi y col., 2010). Esta controversia puede deberse a las distintas subpoblaciones de células NK que se activan en el transcurso de la enfermedad. Así, se ha descrito que el subtipo de células NK que expresan el correceptor NKG2D producen daño directo en oligodendrocitos y astrocitos (Saikali y col., 2007, Fogel y col., 2013). Sin embargo, la población de células NK que expresan en su membrana receptores similares a los de las células T, denominadas células NKT, son capaces de inhibir a las Th1 y Th17 mediante la secreción de IL-4 e IL-10, protegiendo así de la EAE (Matsumoto y col., 1998, Morandi y col., 2008, Sakuishi y col., 2010, Chanvillard y col., 2013, Simoni y col., 2013). En el presente estudio, existe una disminución de los niveles de las células NKT en las ratas con EAE-CR, lo que sugiere que en nuestro modelo, dicha disminución podría contribuir a aumentar la severidad de la enfermedad.

Los cambios que observamos en las poblaciones de células inmunes en sangre periférica y bazo indican una movilización de dichas células entre ambas localizaciones, lo que concuerda con los estudios de EAE realizados en ratas Agutí (Ringheim y col., 2013) (**Figura 95**). Además, nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en sangre periférica de ratas con EAE-CR. Se ha descrito que células CD4⁺ específicas frente a antígenos de mielina son

capaces de secretar TNF- α e IFN- γ antes de infiltrarse en el SNC en modelos de EAE en ratón, lo que podría explicar nuestros resultados (Merrill y col., 1992). El aumento de dichas citoquinas contribuye, además, a la movilización de estas células y a un aumento en su grado de activación (Flügel y col., 2001).

En el caso de las ratas con EAE-CR+PEA, no se observan diferencias significativas en la mayoría de los parámetros estudiados respecto a los valores control, a excepción del porcentaje de células NK de sangre periférica y bazo, y de las subpoblaciones de células T en el periodo entre brotes y en el segundo brote en el bazo (**Figura 95**). Por un lado, las mínimas variaciones en las poblaciones de células T y B en sangre periférica sugieren que la sal de PEA podría bloquear, al menos en parte, la activación de éstas células inmunes en las primeras fases de la enfermedad. En este sentido, se sabe que para la activación de las células T específicas de antígeno, se requiere que en la membrana plasmática haya una reorganización de los “lipid rafts”, donde se localizan los receptores CD4 (Crise y Rose, 1992, Millán y col., 1999, Brown y Thiele, 2000), CD8 (Arcaro y col., 2000) y otras proteínas implicadas en las primeras fases de la activación (Shenoy y col., 1994, Kwong y col., 1997, Legler y col., 2001, Lee y Watson, 2006). Estos “lipid rafts”, donde se localizan dichos receptores, son microdominios ricos en colesterol y diversos esfingolípidos. Se sabe que la dipalmitoil-fosfatidiletanolamina y la N-aciletanolamina participan en la reordenación y compartimentación de los “lipid rafts” (Eren y col., 2006, Dong y col., 2012, Hou y col., 2012, Rimmerman y col., 2012, Bosch y col., 2013, Izsepi y col., 2013, Tamarit y col., 2013). Variaciones en las proporciones de estos componentes podrían desencadenar la desestructuración de los “lipid rafts” y, por tanto, alteraciones en las vías de señalización asociadas (Hattersley y col., 2013). Por ello, la sal de PEA podría intervenir en la redistribución de los “lipid rafts”, impidiendo o dificultando la activación de estas células. Por otro lado, se ha demostrado que un derivado de etanolamina, la palmitoiletanolamina, reduce la inflamación a través de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas- α (PPAR- α) en los linfocitos (Lo Verme y col., 2005), es capaz de inhibir la degranulación de los mastocitos en sangre periférica (De Filippis y col., 2009) y de reducir procesos alérgicos e inflamatorios en animales (Hansen, 2010). A pesar de ello, los resultados de las poblaciones de células T en bazo muestran un cambio en los porcentajes de las células CD4⁺ y CD8⁺ en el periodo entre

brotes y en el segundo brote, aunque el número total de células T en bazo y en sangre periférica se mantienen similares al valor control. Hay derivados de fosfoetanolamina que, en procesos alérgicos, son capaces de inducir, a ciertas dosis, la diferenciación a células CD4⁺ en sangre periférica (Agea y col., 2005). Estos datos inducen a pensar que la dosis de sal de PEA que administramos a las ratas con EAE-CR no es capaz de bloquear, completamente, la diferenciación de estas células.

El aumento de los niveles de células NK, tanto en las ratas control con PEA como en las ratas con EAE-CR+PEA, podría atribuirse a que ciertos derivados de etanolamina son capaces de inducir la proliferación de las células NK (Pierson y col., 1995, Agea y col., 2005). En el presente estudio, la sal de PEA aumenta los niveles de las células NKT y, como hemos comentado anteriormente, no aumentan los niveles de células T, lo que sugiere que la sal de PEA podría inducir la movilización de células que posiblemente inhiben la proliferación o la activación de las células T. Además, el aumento de células NKT podría explicar, en parte, el aumento de los niveles de IFN- γ encontrado en sangre periférica en estas ratas (Kim y col., 2002) dado que, recientemente, se ha planteado que esta citoquina secretada por células NKT activas puede contribuir al reclutamiento de células progenitoras hematopoyéticas de médula espinal (MDSCs), las cuales tienen una función inmunosupresora sobre las células T (Parekh y col., 2013). Estudios recientes en pacientes con EM han descrito una disminución del número de células NKT en sangre periférica que contribuye a aumentar la severidad de la enfermedad (Emmanouil y col., 2009, Fogel y col., 2013, Simoni y col., 2013). Por ello, el efecto de la sal de PEA sobre las poblaciones de células NKT podría tener importancia terapéutica.

Estudios previos han demostrado que ciertas regiones de la zona periventricular y del tronco encefálico (Tonra y col., 2001, Muller y col., 2005, Silwedel y Förster, 2006) son áreas particularmente susceptibles de presentar alteraciones en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) bajo condiciones inflamatorias. Además, recientemente se ha observado que los ventrículos lateral, tercero y cuarto se encuentran aumentados de tamaño en los brotes de EAE (Lepore y col., 2013), lo que hace suponer que éstas son las zonas de entrada de linfocitos al cerebro. Nuestros estudios demuestran, por una parte, que en el parénquima cerebral de ratas con EAE-CR, en los tres brotes de la enfermedad, existen infiltrados de células T CD3⁺, T CD8⁺ e Iba1⁺ así

como altos niveles de IgG, concordante con los estudios de infiltrados de células T CD3⁺ (incluyendo CD4⁺, CD8⁺ y células $\gamma\delta$ T), células B y macrófagos en médula espinal (Almolda y col., 2011, Zhang y col., 2011), en cuerpo caloso (Kang y col., 2012) y en LCR (Babbe y col., 2000) de ratas y ratones con EAE. Asimismo, los datos en las ratas con EAE-CR+PEA muestran una menor infiltración de células en los tres periodos de la enfermedad, lo que sugiere que la sal de PEA podría disminuir dicha infiltración en parénquima cerebral.

En las ratas con EAE-CR, los infiltrados de células T se encuentran distribuidos por todo el parénquima cerebral, aunque se localizan principalmente alrededor de los vasos sanguíneos. Las células CD3⁺ que no son CD8⁺ se pueden considerar como células CD4⁺, y se localizan por toda la placa inflamatoria, mientras que las células CD8⁺ se localizan principalmente en las zonas centrales de las placas, lo que coincide con las primeras observaciones realizadas en parénquima cerebral de pacientes con EM (Gay y col., 1997, Gay, 2006). El papel de las células CD4⁺ activadas es secretar citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-2 con el fin de activar a las células CD8⁺ y a otros tipos celulares. Esto podría explicar el número de células CD8⁺ encontradas en el parénquima cerebral.

En las ratas con EAE-CR, observamos un aumento en el número y grado de actividad de las células Iba-1⁺ en parénquima cerebral. En el primer y segundo brote, estas células se localizan principalmente alrededor de los infiltrados de células T. Las células Iba-1⁺ reclutan células T y dañan neuronas y oligodendrocitos mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias (que activan a linfocitos T), radicales libres y proteasas (Minagar y col., 2002, Raivich y Banati, 2004, Sanders y De Keyser, 2007, Rawji y Yong, 2013). Por otro lado, en el periodo entre brotes, estas células se localizan por todo el parénquima, lo que podría relacionarse con procesos de regeneración axonal, ya que se ha demostrado que en las fases de recuperación, secretan factores tróficos y eliminan restos de mielina (Benveniste, 1997, Raivich y Banati, 2004, Napoli y Neumann, 2010, Rawji y Yong, 2013). En resumen, la microglía reactiva podría tener efectos neuroprotectores o neuroinflamatorios, dependiendo del brote en el que se encuentre y, posiblemente, ambos podrían existir dentro de un mismo brote.

En este trabajo, hemos observado un aumento de los niveles de IgG en las áreas cerebrales donde existen mayor número de infiltrados. Estos datos coinciden con

modelos de EAE realizados en ratones C57BL/6 a los que se les administró células T activadas frente a MOG, en los cuales se observó una colocalización de células B y altas cantidades de IgG (Mannara y col., 2012). Estos datos apoyan la idea de que los linfocitos B podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad, ya que las células B foliculares podrían producir alta cantidad de anticuerpos IgG en una respuesta dependiente de células T (Holmøy, 2009, Ray y col., 2011, Weber y col., 2011). Además, recientemente, se ha descrito que la administración de IgG aisladas de pacientes con EM a ratones con EAE aumenta la parálisis, los infiltrados del SNC y la desmielinización (Pedotti y col., 2013). Las células T, las células Iba-1⁺ y las inmunoglobulinas realizan acciones citotóxicas frente a oligodendrocitos, neuronas y astrocitos, lo que explicaría el número de células TUNEL(+) y las placas desmielinizantes que se observan en las áreas que coinciden con las placas inflamatorias.

En las ratas con EAE-CR+PEA, se observa un menor número de infiltrados inflamatorios de células T CD3⁺ y CD8⁺ en el parénquima cerebral, en las tres fases de la enfermedad. Esto puede deberse a una inhibición del número de células T activadas en sangre periférica. Por otro lado, nuestros resultados muestran un menor número de células Iba-1⁺, posiblemente debido a la menor cantidad de infiltrados de células T, lo que disminuiría la activación de este tipo celular. Podría deberse también al efecto del PEA, ya que estudios en cultivos organotípicos de células gliales han demostrado que la palmitoiletanolamina es capaz de disminuir la activación de estas células (Scuderi y col., 2012). Además, algunos estudios han demostrado que las prostaglandin-etanolaminas E₂ son capaces de suprimir la producción de TNF- α por parte de los monocitos, lo que les confiere un papel inmunomodulador (Brown y col., 2013). En estas ratas con EAE-CR+PEA, observamos una menor cantidad de IgG y un menor número de células TUNEL(+). Estos resultados sugieren un efecto protector de la sal de PEA debido, principalmente, a una inhibición de la activación de estas células en sangre periférica. Además, dicha sal es capaz de mantener los niveles de las citoquinas proinflamatorias similares a los valores control y de disminuir los radicales libres en el parénquima cerebral. Recientemente, se ha observado que el tratamiento con fosfatidiletanolamina atenúa la apoptosis en modelos animales de enfermedad de Parkinson (Esposito y col., 2011, Esposito y col., 2012).

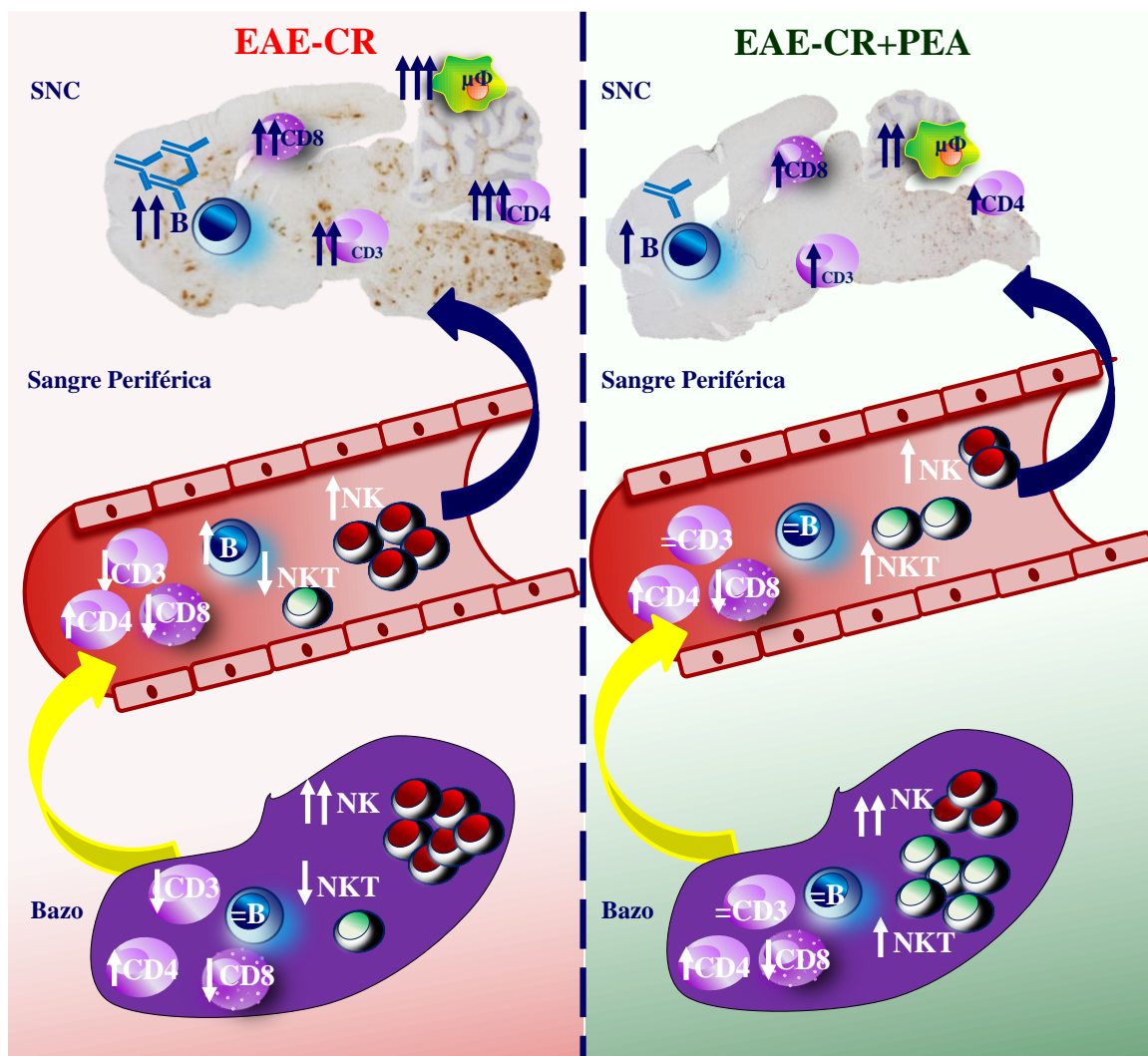


Figura 95: Esquema representativo de la extravasación linfocitaria en el primer y segundo brote de la EAE-CR. En la imagen, se muestran dos fotografías representativas de cerebros de rata con EAE-CR (panel izquierdo) y EAE-CR+PEA (panel derecho).

Entre las áreas cerebrales encargadas del control del movimiento, nos hemos centrado en el cerebelo ya que en modelos realizados con MOG, se ha observado que la BHE en el cerebelo presenta alteraciones de permeabilidad desde el comienzo del desarrollo de la EAE (Rausch y col., 2003, Floris y col., 2004, Müller y col., 2007).

Nuestros resultados muestran que en las ratas con EAE-CR, los lóbulos anteriores (1°-3°) así como el 4°, 5° y 6° lóbulo del cerebelo presentan mayor inflamación que los lóbulos 7° a 10°. Además, las placas inflamatorias en estos animales son muy densas y de gran tamaño. El estudio de las placas inflamatorias muestra gran cantidad de células $CD3^{+}$ y $CD8^{+}$. Durante el primer brote, estas placas se localizan

principalmente en la sustancia blanca mientras que en el segundo brote, aparecen tanto en la sustancia blanca como en la capa granular. Además, en el segundo brote, hay un aumento del número de células CD8⁺ en comparación con el primer brote, lo que sugiere una mayor actividad citotóxica por parte de estas células que provocaría un aumento de la desmielinización y, como consecuencia, mayor daño axonal (Sobottka y col., 2009). También observamos que las ratas con EAE-CR presentan un aumento en el número y grado de activación de las células Iba-1⁺, las cuales en el primer y segundo brote, se localizan principalmente alrededor de los infiltrados de células T. En el periodo entre brotes, dichas células se localizan por todo el parénquima del cerebelo.

En los tres periodos de la enfermedad, observamos un aumento en los niveles de IgG en el cerebelo, siendo más intenso en el primer brote. Estos resultados coinciden con estudios realizados en extractos de SNC de cobayas en modelos de EAE-CR, donde se observa un aumento del cociente IgG/albúmina durante el primer brote (Mehta y col., 1981, Greenlee y col., 1995). El aumento de IgG podría producir daño directo en las células del cerebelo y, especialmente, en las células de Purkinje, ya que se ha descrito que animales a los que se les administra inmunotoxina conjugada con IgG presentan una destrucción de las células de Purkinje (Bollók y col., 1983, Davis y Wiley, 1989, Riedel y col., 1990, Muraszko y col., 1993). Además, se ha descrito una disminución significativa del número de células de Purkinje en ratones inmunizados con MOG (MacKenzie-Graham y col., 2009). Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, las placas desmielinizantes observadas en las tinciones de Fast/Blue-PAS y el alto número de células TUNEL(+) que encontramos tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris.

El análisis comparativo, en las ratas con EAE-CR, de los daños presentes en los distintos lóbulos del cerebelo a lo largo de los tres brotes de la enfermedad muestra que los lóbulos 1°-6° presentan una mayor alteración que los lóbulos 7-10°. Estas alteraciones podrían explicar los trastornos motores que presentan estas ratas en el primer brote y las ataxias del segundo brote, dado que los lóbulos 1°-3° se encargan de la ejecución motora (tono muscular, postura y locomoción) y los lóbulos 4°-6° se encargan de la planificación motora (coordinación y metría de los movimientos).

En las ratas con EAE-CR+PEA, los lóbulos 1°-6° presentan un mayor número de infiltrados que los lóbulos 7°-10°, aunque las placas que se observan son de menor

tamaño y menos densas que en las ratas con EAE-CR. Estos resultados muestran, por un lado, que los lóbulos encargados del control del movimiento son los más afectados, de modo similar a lo que sucede en las ratas con EAE-CR y, por otro lado, demuestran una menor infiltración linfocitaria, ya que las placas son de menor tamaño y menos densas. Ambos datos apoyan la mejoría en la movilidad de estas ratas en comparación con las ratas con EAE-CR. Cabe destacar que en estas ratas, la mayor cantidad de IgG se localiza en la zona cercana al cuarto ventrículo y en los plexos coroideos, lo que sugiere que las células B se infiltran en el cerebelo a través del cuarto ventrículo.

Se ha descrito que aproximadamente el 50% de los pacientes con EM presentan dificultades en el aprendizaje y alteraciones en la memoria a corto plazo (Peyser y col., 1990, Bobholz y Rao, 2003, Chiaravalloti y DeLuca, 2008, Patti, 2012, Amato y col., 2013a, Amato y col., 2013b). Por ello, en nuestro estudio, también valoramos áreas cerebrales implicadas en procesos de codificación, almacenamiento y recuperación de la memoria de tipo episódico y semántico. Entre las áreas temporales analizadas, decidimos estudiar el hipocampo y la zona parahipocámpal y, entre las áreas del diencefalo, los cuerpos mamilares. Los centros nerviosos de estas áreas cerebrales están conectadas por numerosas vías nerviosas, tanto aferentes como eferentes, y forman el denominado circuito de Papez.

Existen pocos estudios sobre las alteraciones de los cuerpos mamilares en la EM aunque, recientemente, estudios con RMN han demostrado que existen alteraciones estructurales en esta área cerebral en pacientes con EM que presentan un segundo brote y que, además, presentan dificultades en la memoria a corto plazo (Ozturk y col., 2008, Dineen y col., 2012). Nuestros resultados muestran, por primera vez, que en este modelo animal, las ratas con EAE-CR presentan un gran infiltrado de células T CD3⁺ y T CD8⁺ en los cuerpos mamilares en los tres periodos de la enfermedad, siendo mayores en el primer brote y en el periodo entre brotes. Asimismo, observamos un alto número de células Iba-1⁺ activas en los tres periodos de la enfermedad. Por último, encontramos un aumento de los niveles de IgG, especialmente en el primer y segundo brote. Como se ha mencionado anteriormente, estos componentes del sistema inmune realizan su acción frente a neuronas y oligodendrocitos provocando muerte celular, lo que podría explicar el alto número de células TUNEL(+) encontradas en estas áreas. Estos datos indican que los centros neuronales localizados en los cuerpos mamilares en las ratas con EAE-CR

están afectados. El estudio por tinción Fast/Blue-PAS de las vías nerviosas que conectan con el hipocampo muestran un alto grado de desmielinización, lo que podría alterar las conexiones de dichas áreas y podría implicar alteraciones en la memoria. En las ratas con EAE-CR+PEA, observamos que los infiltrados inflamatorios presentes en los cuerpos mamilares son menores en comparación con las ratas con EAE-CR y, además, mucho más difusos. También observamos una disminución en el número de células TUNEL(+) y menor cantidad de placas desmielinizantes, lo que sugiere que los centros nerviosos en dicha área cerebral están menos afectados.

El estudio histológico del hipocampo de las ratas con EAE-CR muestra, de forma similar a las áreas anteriormente descritas, infiltrados de células T en los tres periodos de la enfermedad, aunque los mayores infiltrados ocurren en el segundo brote. También se observa un aumento en el número y grado de activación de la microglía en las ratas con EAE-CR, en el primer y segundo brote. Es interesante observar que, además, estas células se localizan principalmente en áreas implicadas en la integración de estímulos y en procesos de memoria como son el giro dentado, un área hipocampal con intensa neurogénesis implicada en procesos de memoria, la capa molecular, que es un área al que llegan los axones de diferentes árboles dendríticos de las células granulares, y el estrato *oriens* del hipocampo, en el cual se encuentran neuronas que dan soporte a las células piramidales. Nuestros resultados también muestran un aumento de los niveles de IgG, especialmente en el segundo brote. Asimismo, en las ratas con EAE-CR, hay un aumento de los niveles de TNF- α e IFN- γ , especialmente en el primer y segundo brote, coincidiendo con estudios en modelos agudos de EAE (Aguado-Llera y col., 2011). Los niveles de IFN- γ están muy elevados en el segundo brote, coincidiendo con el mayor aumento de células infiltradas activas. El efecto biológico de estas citoquinas en el parénquima cerebral es controvertido. Así, se ha demostrado que el TNF- α puede tener tanto efectos neuroprotectores como neuroinflamatorios en función de sus niveles y de las vías de señalización que active (Venters y col., 2000, Kraft y col., 2009). Estudios del circuito dopaminérgico nigroestriatal en ratones adultos han mostrado que niveles bajos de TNF- α son neuroprotectores mientras que niveles elevados crónicos son neurodegenerativos (Chertoff y col., 2011). Las vías de señalización implicadas en uno u otro efecto dependen del tipo de receptor de TNF- α que se active y de las señales coactivadoras que le lleguen, como la vía del NF κ B o la

vía de JNK. En el primer brote, nuestros resultados en el hipocampo muestran un ligero aumento del TNF- α pero no un gran número de células TUNEL(+), por lo que es posible que en este periodo, dicha citoquina actúe como neuroprotector. En cambio, en el segundo brote, observamos un aumento de TNF- α así como un aumento del número de células TUNEL(+), lo que sugiere que en esta fase de la enfermedad, dicha citoquina podría tener un papel deletéreo en el hipocampo, bien activando procesos oxidativos o inhibiendo vías de supervivencia (Venters y col., 2000) (**Figura 96**). Por otro lado, hemos demostrado un aumento de los niveles proteicos de la fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina, en el primer brote y un ligero aumento, sin ser significativo, en el segundo brote. En procesos inflamatorios, el TNF- α recluta la calcineurina para activar la vía clásica de la inflamación a través de los factores de transcripción NF κ B o NFAT (Fernandez y col., 2007, Somvanshi y col., 2011b, Pei y col., 2014, Somvanshi y col., 2014, Wong y col., 2014)., aunque también se ha observado que en astrocitos reactivos, la calcineurina es capaz de activar vías de supervivencia cuando le llegan estímulos neuroprotectores como IGF-1, o enzimas antioxidantes como la SOD. Dado el número de células TUNEL(+) que encontramos en el hipocampo, es posible que en el primer brote, la calcineurina tenga un papel neuroprotector mientras que en el segundo brote, su papel sea deletéreo (Fernandez y col., 2007) (**Figura 96**).

En las ratas con EAE-CR+PEA, los infiltrados inflamatorios, el grado de activación de la microglía y los niveles de IgG, son menores en comparación con las ratas con EAE-CR, lo que indica un efecto supresor de la sal sobre la migración linfocitaria y activación de las células microgliales en el hipocampo (**Figura 95** y **Figura 96**).

La acción citotóxica de estas células inmunológicas se realiza principalmente por la secreción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), los cuales provocan daño a nivel de proteínas, lípidos y ADN. Las células contienen sistemas enzimáticos para minimizar el efecto deletéreo de dichas especies reactivas. En este estudio, demostramos que en las ratas con EAE-CR, existe una disfunción de la actividad y cantidad de enzimas antioxidantes en el hipocampo a lo largo de las tres fases de la enfermedad y que la sal de PEA atenúa dichas alteraciones. Además, nuestros resultados muestran un incremento de la peroxidación lipídica en el primer y segundo brote, en el hipocampo de ratas con EAE-CR, siendo mucho más intenso en

este último. Este incremento se podría relacionar con un aumento de la producción de ERO y ERN por células inmunológicas activadas, por una disfunción en la actividad de las defensas antioxidantes que hemos observado (**Figura 97** y **Figura 98**) y/o por el aumento de citoquinas proinflamatorias, ya que se ha demostrado que ciertas citoquinas, como el TNF- α y la IL-1, son capaces de producir radicales libres por activación de diferentes enzimas. En células endoteliales de la BHE, el TNF- α induce un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa, lo que provoca un aumento de especies reactivas como el O_2^{\bullet} y muerte celular de dichas células por apoptosis (Basuroy y col., 2009). Además, se ha observado que el aumento del TNF- α producido por la microglía en la enfermedad de Parkinson causa la muerte de neuronas dopaminérgicas a través de un mecanismo mediado por la NADPH oxidasa (Borrajo y col., 2014). Por otro lado, estudios en cultivos celulares de astrocitos y oligodendrocitos en presencia del péptido β -amiloide ($A\beta$) han mostrado un aumento de la secreción de TNF- α e IL-1, que activan a la iNOS y a la SOD, lo que implica un aumento de radicales libres (Ayasolla y col., 2004, Zeng y col., 2005). Asimismo, se ha descrito, en estudios *post-mórtem* de lesiones de pacientes con EM, un aumento de los niveles de TNF- α e IL-1 β en las placas desmielinizantes, que activarían la síntesis de ceramidas a través de la esfingomielanasa (van Doorn y col., 2012). Las ceramidas o sus derivados glicosilados son capaces de inducir a la iNOS, producir disfunción mitocondrial y aumentar la actividad de la NADPH oxidasa y de la SOD, lo que conlleva a un aumento de ERO y ERN. Estudios previos en la EAE han mostrado que existe un aumento en los niveles del anión superóxido (O_2^{\bullet}) (MacMicking y col., 1992, Scott y col., 1996, Scott y Bolton, 2000) que podría provocar la activación de ciertas enzimas antioxidantes como la SOD y la inhibición de otras enzimas antioxidantes como la CAT (Kono y Fridovich, 1982, Shimizu y col., 1984). El resultado es un aumento de radicales libres que podrían provocar una alteración en la organización de las membranas celulares y daño de distintas macromoléculas como lípidos y proteínas de membrana.

DEGENERACIÓN

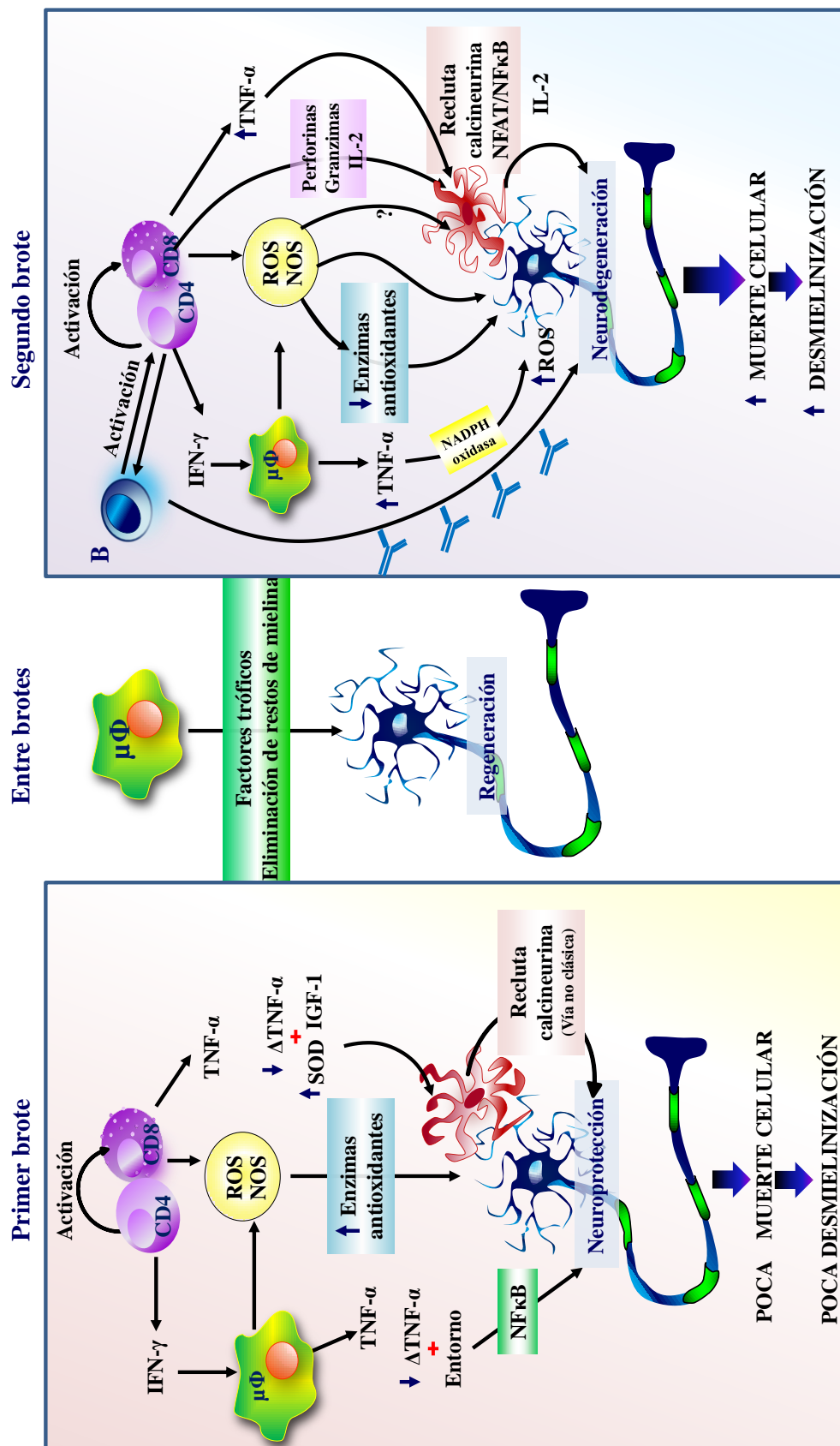


Figura 96: Esquema integrativo de la interacción de las células del sistema inmune con astrocitos y neuronas en el hipocampo de ratas con EAE-CR en los tres periodos de la enfermedad.

Nuestros resultados en hipocampo de ratas con EAE-CR muestran una disfunción en la actividad de las defensas antioxidantes. Así, se observó un incremento en la actividad y en los niveles proteicos de la SOD en comparación con las ratas control, posiblemente causado por un aumento de los niveles de O_2^{\bullet} , que es su principal activador alostérico (Halliwell y Gutteridge, 1992). La expresión de SOD aumenta en numerosas enfermedades neurodegenerativas que tienen un componente de estrés oxidativo en su patogenia, como la enfermedad de Alzheimer (Delacourte y col., 1988, Ceballos y col., 1991). En la EM, se ha descrito una sobreexpresión del gen de la SOD1 en las placas desmielinizantes de cerebelo (Tajouri y col., 2003) así como un incremento en la SOD2 en el nervio óptico de cerdos con EAE (Qi y col., 1997), resultados que concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

Nuestros resultados también muestran una disminución en la actividad y en los niveles proteicos de la CAT en el hipocampo de las ratas con EAE-CR, con respecto al grupo control, en los tres periodos de la enfermedad. En estudios con homogenados de cerebro de ratas con EAE, se ha observado una disminución de la función peroxisomal, que se acompaña de una reducción en la expresión del gen CAT así como de la actividad CAT (Singh y col., 2004, Sajad y col., 2009). Estos resultados tienen interés dado que varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos del tratamiento con CAT contra el desarrollo de la EAE (Ruuls y col., 1995, Guy y col., 1998, Liu y col., 2006).

La disminución de la actividad de la CAT nos condujo a analizar en profundidad otro sistema de detoxificación del H_2O_2 como es el sistema del glutatión. Nuestros resultados demuestran que en las ratas con EAE-CR, existe un aumento tanto de la actividad como de los niveles proteicos de la GP en el primer brote, mientras que en el segundo brote se observa una disminución tanto en la actividad como en los niveles proteicos. Esta enzima juega un papel central en la eliminación de peróxidos tóxicos. El aumento de la actividad GP en el hipocampo de ratas con EAE-CR, en el primer brote, podría reflejar el intento, por parte de las células, de contrarrestar el aumento de H_2O_2 . Por otro lado, los niveles proteicos y la actividad de la GR, que cataliza la regeneración de GSH a partir GSSG, se encuentran elevados en el primer y segundo brote de la enfermedad. La elevación de la actividad GR observada en el segundo brote en las ratas con EAE-CR, junto con la disminución de la actividad y los niveles proteicos de la GP,

podría explicar, en parte, el aumento de GSH en este brote. El agotamiento de GSH se limitó al primer brote. Este hallazgo coincide con los resultados obtenidos en plasma procedente de ratones con EAE (Zargari y col., 2007) y en LCR de pacientes que padecen EM (Calabrese y col., 2003). En realidad, la disminución de GSH se considera un evento temprano de la enfermedad (Sajad M. y col., 2009). La disminución de GSH, junto con la disfunción de las enzimas GP y GR implican un aumento del número de especies reactivas, lo cual favorecería el aumento de los niveles de ERO (Liu y col., 2003, Ilhan y col., 2004).

Este estudio demuestra que el contenido de colesterol en las membranas de hipocampo aumenta en el primer y segundo brote de la EAE-CR, aunque en menor medida en este último, y que vuelven a valores similares al control en la fase de remisión (entre brotes). Estos resultados se relacionan con el hecho de que el estrés oxidativo asociado a las membranas del cerebro induce la acumulación de colesterol (Cutler y col., 2004, Kuehnle y col., 2008, Ayoub y col., 2011). En este sentido, estudios en líneas celulares no neuronales han demostrado que el estrés oxidativo puede favorecer el acumulo de colesterol (Stein y col., 1992, Suzukawa y col., 1994, Gesquiere y col., 1999, Zager y Kalhorn, 2000). Asimismo, estudios *post-mórtem* en el cerebro de pacientes con EM indican que el contenido de colesterol aumenta en comparación con los pacientes control (Pitkanen y col., 1986). Concomitante con el aumento de colesterol en membranas de hipocampo, se encontró una disminución en el contenido de desmosterol. El desmosterol se convierte en colesterol a través de una reacción catalizada por la enzima 3β -hidroxisterol- $\Delta 24$ reductasa (DHCR24; hDiminuto/Seladina-1) (Waterham y col., 2001, Wechsler y col., 2003, Crameri y col., 2006). Estudios sobre los niveles endógenos de la DHCR24/seladina-1 y estrés oxidativo muestran que un aumento agudo de los niveles de estrés oxidativo induce un aumento de dicha enzima (Wu y col., 2004, Benvenuti y col., 2006). Sin embargo, una exposición crónica a niveles elevados de especies reactivas reduce los niveles proteicos de dicha enzima (Benvenuti y col., 2006), lo que sugiere que la DHCR24/seladin-1 podría jugar un papel en la integración de las respuestas celulares al estrés oxidativo. Varios estudios han descrito que el aumento de la síntesis de colesterol contrarresta, potencialmente, la peroxidación lipídica asociada al estrés oxidativo, manteniendo así la integridad de la membrana plasmática (Kuehnle y col., 2008).

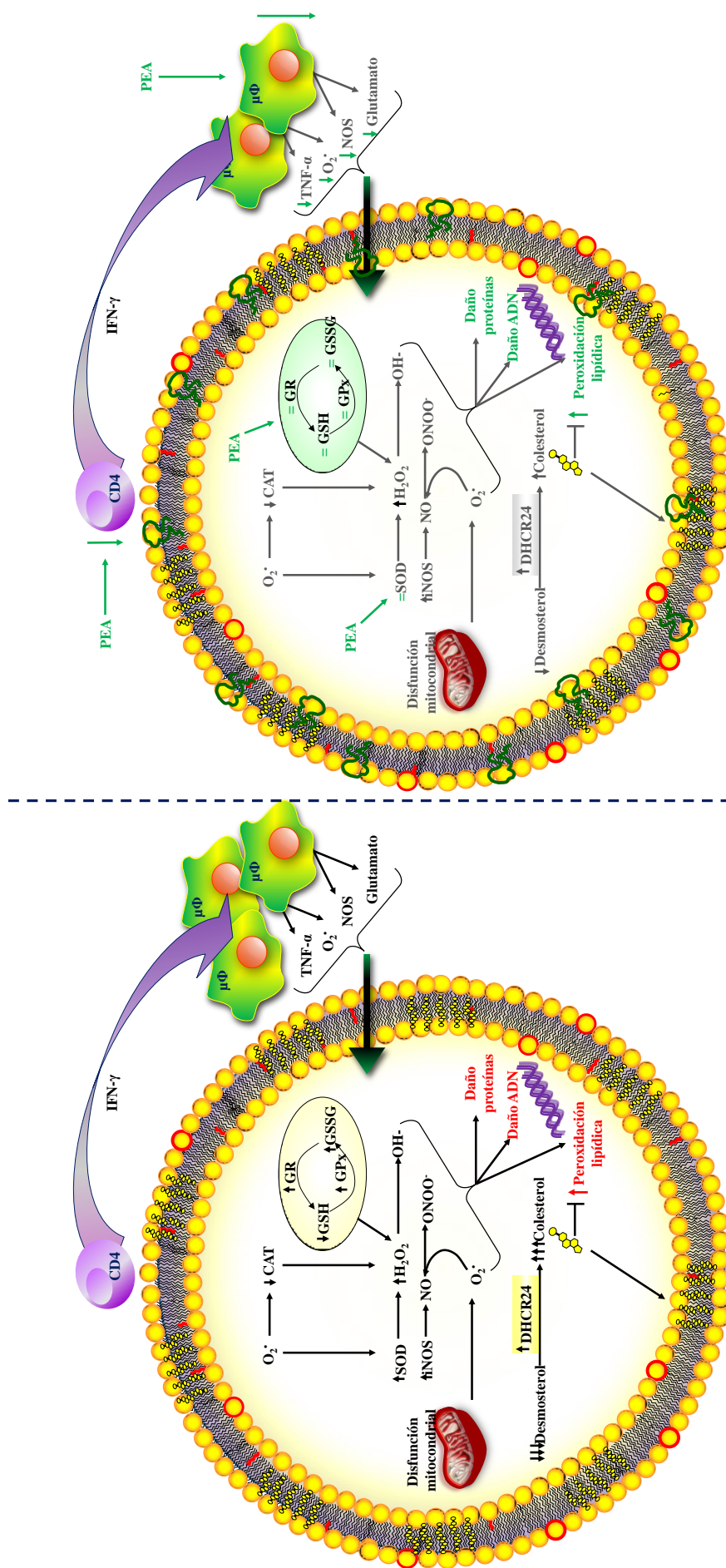


Figura 97: Panel izquierdo: Representación esquemática de las alteraciones en las defensas antioxidantes en el hipocampo de ratas con EAE-CR en el primer brote de la enfermedad. Panel derecho: Representación esquemática del efecto de la sal de PEA sobre las alteraciones en las defensas antioxidantes en el hipocampo de ratas con EAE-CR en el primer brote de la enfermedad. En verde, se representa la sal de PEA. CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; GR: glutathione reductasa; GSH: glutathione reducido; DHCR24: 3β-hidroxiestero-Δ24reductasa. H₂O₂: peróxido de hidrógeno; OH·: ión hidroxilo; O₂·⁻: anión superóxido; DHCR24: 3β-hidroxiestero-Δ24reductasa.

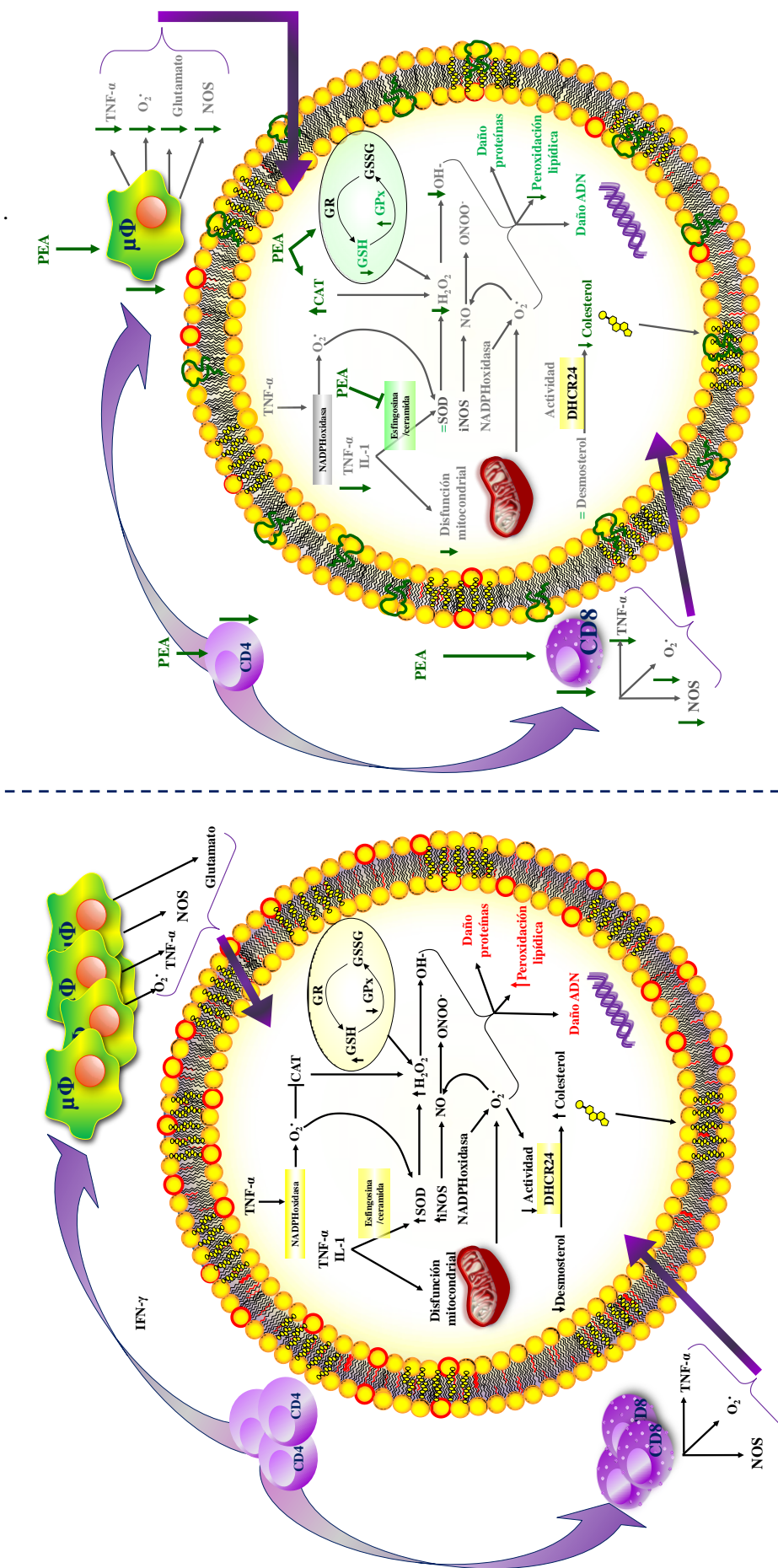


Figura 98: Panel izquierdo: Representación esquemática de las alteraciones en las defensas antioxidantes en el hipocampo de ratas con EAE-CR en el segundo brote de la enfermedad. Panel derecho: Representación esquemática del efecto de la sal de PEA sobre las alteraciones en las defensas antioxidantes en el hipocampo de ratas con EAE-CR en el segundo brote de la enfermedad. En las figuras, se representa en rojo la peroxidación lipídica en la membrana. En verde, se representa la sal de PEA. CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; GR: glutatión reductasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; OH⁻: ión hidróxido; O₂^{•-}: anión superóxido; DHCR24: 3β-hidroxiesteroide-Δ24-reductasa

El aumento en la actividad de la SOD, la disminución en la actividad de la CAT, así como la disminución del sistema de detoxificación del glutathione podría inducir un aumento en la concentración de H_2O_2 (de Oliveira y col., 2007). El aumento de H_2O_2 a través de una reacción con hierro o cobre (reacción química de Fenton) facilita la producción del radical hidroxilo (HO^\bullet), el cual es la molécula oxidante más potente (Halliwell, 2006). Por tanto, este desajuste en el sistema SOD-CAT y del glutathione, así como los aumentos en los niveles de $TNF-\alpha$, podrían ser los responsables del aumento de los niveles de peroxidación lipídica en este grupo experimental. Estas alteraciones podrían explicar los resultados obtenidos de células TUNEL(+) en el hipocampo y las placas desmielinizantes que se observan en las ramas aferentes y eferentes del hipocampo que conectan con otros centros nerviosos, como son los localizados en el circuito de Papez. Además, se observa que el mayor número de células TUNEL(+) y la mayor desmielinización ocurren en el segundo brote, lo que implica que la degeneración de esta área cerebral es consecuencia no solo del aumento de células inmunes infiltradas sino también de la disfunción en la actividad de las enzimas antioxidantes.

El tratamiento con la sal de PEA mantuvo en valores control las actividades y los niveles proteicos de las enzimas antioxidantes en aquellas ratas con EAE-CR pretratadas con dicha sal que no alcanzaron el grado 3. Las ratas con EAE-CR+PEA que sí alcanzaron el grado 3 presentaron alteraciones similares a las ratas con EAE-CR, aunque no tan severas. Los efectos del PEA podrían atribuirse a la disminución de los infiltrados linfocitarios y del grado de activación de las células microgliales, lo que reduce la producción de ERO y ERN y, por otra parte, a las propiedades antioxidantes que han demostrado tener los derivados de etanolamina (Kuczynski y Reo, 2006). Así, se ha demostrado que el N-metiletanolamina es capaz de prevenir la muerte celular por apoptosis causada por ERO en cultivos celulares de oligodendrocitos (Brand y col., 2000). Estudios realizados en cultivos celulares con plasmalógenos de etanolamina también han mostrado que éstos protegen a las células del estrés oxidativo y, más concretamente, a las membranas ricas en colesterol, a través de los enlaces vinil éter que poseen en su estructura (Zoeller y col., 1999, Maeba y col., 2002, Maeba y Ueta, 2003a, b, 2004). Los plasmalógenos de etanolamina poseen una forma hexagonal que contribuye a estabilizar la estructura de la membrana (Maeba y col., 2002). En conjunto, la sal de PEA en las ratas con EAE-CR disminuye los niveles de estrés oxidativo lo que

podría explicar que los niveles de colesterol en estas ratas sean menores que en las ratas con EAE-CR. Otros estudios de isquemia cerebral con derivados del N-aciletanolamina (18:1) han descrito que éstos tienen efectos protectores al inhibir la síntesis de ceramidas por la inhibición de la enzima ceraminidasa (Hansen y col., 2000, Hansen y col., 2002, Garg y col., 2010). Asimismo, en gliosis activa producida por el péptido β -amiloide, la α -glicerilfosforiletanolamina (α -GPE) es capaz de recuperar la integridad de la membrana mitocondrial de los astrocitos, disminuyendo los radicales libres (Bisaglia y col., 2004).

En procesos inflamatorios, la señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) desencadena la actividad de múltiples factores incluyendo quimioquinas, leucotrienos y neurotransmisores. Pruebas recientes sugieren que la maquinaria de desensibilización de los GPCR, GRK/ β -arrestina, juega un papel vital en el desarrollo y progreso de trastornos inflamatorios, tanto agudos como crónicos (Vroon y col., 2006). Nuestros resultados en las ratas con EAE-CR muestran infiltrados de células inmunes, alteración de enzimas antioxidantes y modificaciones significativas de los niveles proteicos de GRK/ β -arrestina en los tres periodos de la enfermedad. Entre las distintas isoformas de GRK, la GRK2 se encuentra predominantemente en neuronas (Arriza y col., 1992, Lombardi y col., 2004), aunque líneas celulares de origen glial así como cultivos primarios de astrocitos también expresan niveles elevados de GRK2 (Cobelens y col., 2007, Kleibeuker y col., 2008a, Kleibeuker y col., 2008b). En nuestro estudio, los niveles de GRK2 en membranas hipocámpales de ratas con EAE-CR están disminuidos en el primer y segundo brote de la enfermedad. Estos resultados coinciden con modelos animales de artritis reumatoide que, al igual que la EAE-CR, cursan con inflamación y estrés oxidativo (Lombardi y col., 1999, Lombardi y col., 2001). Dicha disminución podría deberse, en parte, a las ERO (Lombardi y col., 2002) y las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α) producidas por las células inmunes, ya que se ha demostrado que ambos tipos moleculares disminuyen los niveles de expresión de GRK2 en leucocitos presentes en sangre (Lombardi y col., 1999, Vroon y col., 2004, Vroon y col., 2005, Vroon y col., 2006). Se sabe, además, que el IFN- γ , el TNF- α y la IL-1 β disminuyen la actividad del promotor de GRK2 en una línea celular de músculo liso aórtico (Ramos-Ruiz y col., 2000). Por otro lado, se ha demostrado que la GRK2 se degrada rápidamente por la vía del proteosoma en un proceso dependiente

de la β -arrestina (Penela y col., 2003) y el grupo de Zheng ha descrito recientemente que en las fases agudas de la EAE, la actividad del proteosoma está muy elevada (Zheng y Bizzozero, 2010). Estos datos se correlacionan con la disminución de los niveles de GRK2 encontrada en el primer brote de la EAE-CR. Por el contrario, los niveles de GRK6 en membranas hipocámpales se encuentran elevados en el segundo brote de la EAE-CR. Estudios *in vivo* en modelos animales de alodinia han descrito que la administración de TNF- α e IL-1 induce un aumento de la expresión de GRK6 en ganglios espinales (Eijkelkamp y col., 2012). También se ha descrito una disminución de la actividad del proteosoma en las fases crónicas de la enfermedad. Todo ello podría contribuir a explicar, al menos en parte, el aumento de los niveles de GRK6 que encontramos en el segundo brote (Zheng y Bizzozero, 2010, 2011). No obstante serán necesarios estudios adicionales para valorar en profundidad la actividad de estas quinasas y así poder evaluar la relevancia de esta vía.

En ratas con EAE-CR, observamos un aumento de los niveles de β -arrestina en membranas de hipocampo en el primer brote de la enfermedad. Estos resultados se podrían relacionar con un intento, por parte de la célula, de internalizar los GPCR que previamente han sido fosforilados por las GRK o por otras quinasas, como las PKC (Yang y Xia, 2006, Celver y col., 2013, Min y col., 2013). Por el contrario, en el segundo brote de esta enfermedad, observamos una disminución de los niveles de β -arrestina en membrana y un aumento de dichos niveles en la fracción citoplasmática, lo que sugiere una menor translocación a la membrana (Shi y col., 2007, Kang y col., 2013).

El pretratamiento con PEA de las ratas con EAE-CR no alteró los niveles de las GRKs en el hipocampo. Este resultado podría deberse a la menor infiltración de células inmunes, a la disminución de los niveles de citoquinas y/o a la disminución del estrés oxidativo en esta área cerebral detectado en dicho grupo experimental.

La SST es un neurotransmisor y neuromodulador que se une a receptores específicos que pertenecen a la familia de los GPCR. Está bien establecido que éste péptido modula procesos sensoriales, locomotores y cognitivos así como el sistema inmune (ten Bokum y col., 2000, Kumar y Grant, 2010, Basivireddy y col., 2013). En el hipocampo, se ha descrito una alta densidad de SSTTR. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado un déficit en la actividad del sistema receptor-

efector de la SST en el estriado e hipocampo de ratas que presentan la forma aguda de la EAE (Aguado-Llera y col., 2005, Hervás-Aguilar y col., 2005). Por ello, y en base a los resultados de GRK y la presencia de infiltrados de células inmunes en el hipocampo obtenidos en el presente estudio, profundizamos en la regulación y en la principal vía de señalización de este neurotransmisor, la vía del AMPc, en dicha área.

Los niveles de SST-IR en extractos de hipocampo de ratas con EAE-CR no se modificaron con respecto a las ratas control. Estos resultados sugieren que ni los estímulos inflamatorios ni el estrés oxidativo que se observan en esta área cerebral alteran la expresión o la secreción de la SST. Esto parece contradecir otros estudios donde se ha demostrado que la EAE aumenta la actividad de los receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y que el NMDA induce un incremento en los niveles de SST extracelular en cerebro de ratas (Hathway y col., 1998), lo que podría conducir a una depleción del contenido intracelular del péptido. No obstante, es tentador especular en un incremento en la liberación de la SST compensada por una mayor expresión del péptido, lo cual explicaría la ausencia de alteraciones en el contenido tisular de SST-IR.

Los análisis de Scatchard de los ensayos de unión de la ^{125}I -Tyr¹¹-SST-14 a sus receptores específicos revelaron una disminución significativa en el número de sitios de unión para el trazador en el grupo de ratas con EAE-CR, tanto en el primer brote como en el segundo brote, una alteración que no se observa en las ratas con EAE-CR+PEA. La disminución en las ratas con EAE-CR podría atribuirse a la disminución en los niveles proteicos del subtipo SSTR3, así como a la alteración del sistema GRK/ β -arrestina en dichos brotes (Gainetdinov y col., 2004). Diversos autores también han observado un paralelismo entre la densidad de receptores de membrana y la expresión de GRK2. Así, el grupo de Ansonoff y col., 2001 demostraron que el tratamiento de ratas hembras con estradiol induce una regulación a la baja de los receptores α -adrenérgicos que se asocia con reducciones concomitantes en la inmunodensidad, la actividad enzimática y los niveles de ARNm de GRK2 en cerebro. Por otra parte, el aumento de los niveles de β -arrestina en membrana en el primer brote, sugiere que podría estar unida a los SSTR, conduciendo a una mayor tasa de internalización de los mismos. En el segundo brote, por el contrario, observamos un aumento de los niveles de GRK6, lo que podría implicar una mayor fosforilación de los SSTR y, por ende, una disminución en su funcionalidad. Alternativamente, el aumento de TNF- α e IFN- γ

detectado en extractos hipocámpales de ratas con EAE-CR podrían inducir la disminución en los niveles proteicos del subtipo SSTR3. En apoyo a esta hipótesis, Yan y col. (2005) observaron que el tratamiento de células endoteliales coronarias humanas con TNF- α reduce tanto los niveles del RNAm de los SSTR como su inmunoreactividad. En el periodo entre brotes de las ratas con EAE-CR, hay un aumento de la unión del trazador que coincide con un aumento de los niveles proteicos de todos los subtipos de SSTR analizados.

En el presente estudio, los niveles proteicos del SSTR2 en la EAE-CR no se alteran significativamente con respecto al valor control, ni en el primer ni en el segundo brote, aunque se observa una ligera disminución en el primer brote. No obstante, el estudio inmunohistoquímico de dicho receptor reveló que en realidad, existen zonas en el hipocampo de ratas con EAE-CR que presentan disminución del receptor y otras zonas en las que hay un aumento del mismo. Esto podría explicar la ausencia de cambios en los niveles proteicos de dicho receptor determinado por inmunoblot. Por otro lado, dado que el anticuerpo empleado en nuestro estudio no discrimina entre las dos isoformas de SSTR2 generados por procesamiento alternativo, el SSTR2A y SSTR2B, no se puede descartar la posibilidad de que los efectos de la EAE-CR sean selectivos para un de estos dos subtipos.

En las ratas con EAE-CR, hay una disminución de la actividad de la enzima AC en membranas de hipocampo así como una disminución en la capacidad de la SST para inhibir la misma. Estas alteraciones revirtieron parcialmente tras la administración de la sal de PEA. La disminución en la actividad AC se correlaciona con una menor expresión de las isoformas ACI, ACV/VI y ACVIII, que son las predominan en el cerebro (Sunahara y Taussig, 2002). Aunque el significado fisiológico de dicha disminución está aún por determinar, resulta interesante ya que estudios recientes apuntan a un papel primordial de la ACVIII en los procesos de aprendizaje y memoria (Zhang y col., 2008). Por consiguiente, es tentador especular que la disminución de dicha isoforma podría contribuir, entre otros factores, a la pérdida cognitiva asociada a la EM. Por otra parte, se ha demostrado que tanto los GPCR como alguno de sus efectores se localizan en zonas de lipid rafts. Estos microdominios ricos en colesterol pueden facilitar o inhibir la interacción entre los receptores y sus efectores, alterando así la señalización de estos últimos (Allen y col., 2007). En este sentido, se ha demostrado

que los lipid rafts influyen en las vías de señalización del receptor de endocannabinoides CB1 a través de la AC (Bari y col., 2006). También se ha observado que en células gliales ciertas isoformas de AC, como la ACVI, se localizan en los lipid rafts. Varios autores han descrito que cuando la AC se localiza en los lipid rafts, se atenúa su actividad estimulada por forskolina (Allen y col. 2007). Así, estudios de receptores β -adrenérgicos en células endoteliales en presencia de colesterol han demostrado una menor producción de AMPc (Prieto y col., 1990). Por otro lado, se ha descrito que la depleción de colesterol aumenta la concentración de AMPc en células endoteliales de aorta e induce una mayor activación de la AC por la forskolina (Allen y col., 2007). Nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de colesterol en membranas hipocámpales de las ratas con EAE-CR. Otros autores han descrito que en ratas con EAE, existe una disminución de los niveles de fosfatidiletanolamina, uno de los fosfolípidos que participan en la formación de los lipid rafts y que le confiere cierta fluidez (Jagannatha y col., 1981; Salvatti y col., 1990). Estos datos sugieren que en las ratas con EAE-CR, hay una variación en la proporción de los constituyentes de los lipid rafts (están enriquecidos en colesterol), lo que podría causar un aumento de la rigidez de la membrana y explicaría la disminución de la actividad de la AC y la menor funcionalidad de los SSTR.

La disminución en la capacidad de la SST de inhibir la AC es probablemente la consecuencia, por un lado, de la disminución en la densidad de los SSTR observada en ratas con EAE-CR y, por otro lado, de la disminución de los niveles proteicos de las isoformas $G\alpha 1$ y $G\alpha 3$ (**Figura 99**), que acoplan los SSTR a la AC.

La disminución de los niveles de AMPc producido por una disminución de los niveles proteicos de AC implicaría una menor actividad de la PKA. Dicha disminución conllevaría una menor fosforilación de factores de transcripción como el CREB. Al disminuir los niveles de p-CREB, podría disminuir la transcripción de distintos genes, como los de SSTR (**Figura 99**). Por otro lado, nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de calcineurina, que puede defosforilar factores de transcripción como p-CREB, lo que también podría contribuir a una menor transcripción de genes, como los de SSTR. La disminución de estos factores de transcripción podría explicar la disminución del subtipo SSTR3 en estas ratas.

En su conjunto, los resultados del sistema receptor-efecto de la SST presentados indican que la EAE-CR disminuye la densidad de los SSTTR y la actividad y expresión de la AC así como la expresión de las proteínas Gi en el hipocampo de la rata. Estos cambios se acompañan de una disfunción de las defensas antioxidantes y de un incremento en la población de linfocitos T. Dichas alteraciones revirtieron parcial - o totalmente tras la administración de PEA. Dado que el estrés oxidativo podría jugar un papel importante en la regulación de procesos inflamatorios y en la actividad de proteínas implicadas en las rutas de señalización de la SST (Lappas y col., 2005a, Lappas y col., 2005b, Li y col., 2008), la capacidad inmunomoduladora y antioxidante del PEA podría contribuir a esta reversión. Por otro lado, la sal de PEA, además de un papel antioxidante e inmunosupresor, posee otras acciones que podrían contribuir a mejorar la EAE-CR. Así, se ha demostrado que la fosfatidiletanolamina regula la actividad y/o localización de ciertas proteínas como las PKC o los receptores β -adrenérgicos (Bostwick y col., 1992).

En las ratas con EAE-CR+PEA, los niveles proteicos de la ACI, ACV/VI y de la proteína *Gia2* así como la actividad de la AC fueron similares a los valores control en los tres periodos de la enfermedad. El efecto de la sal de PEA sobre estos parámetros podría deberse a una mayor fluidez de la membrana, debido a la mayor presencia de fosfatidiletanolamina, a pesar del aumento de colesterol, lo que facilitaría la actividad de la AC así como la de los SSTTR. En apoyo a esta hipótesis, se ha descrito que un derivado de etanolamina, el α -glicerofosfatidiletanolamina, es capaz de estimular la actividad AC mediada por receptores muscarínicos y β -adrenérgicos (Florio y col., 1999).

A la vista de los resultados de este trabajo, la sal de PEA podría tener un efecto beneficioso en prevenir o atenuar el desarrollo y progreso de la EAE-CR, modulando la actividad de enzimas antioxidantes, el sistema inmune y la funcionalidad del sistema receptor-efector de la SST. Por consiguiente, la sal de PEA podría ser un candidato potencial para el tratamiento de la EM.

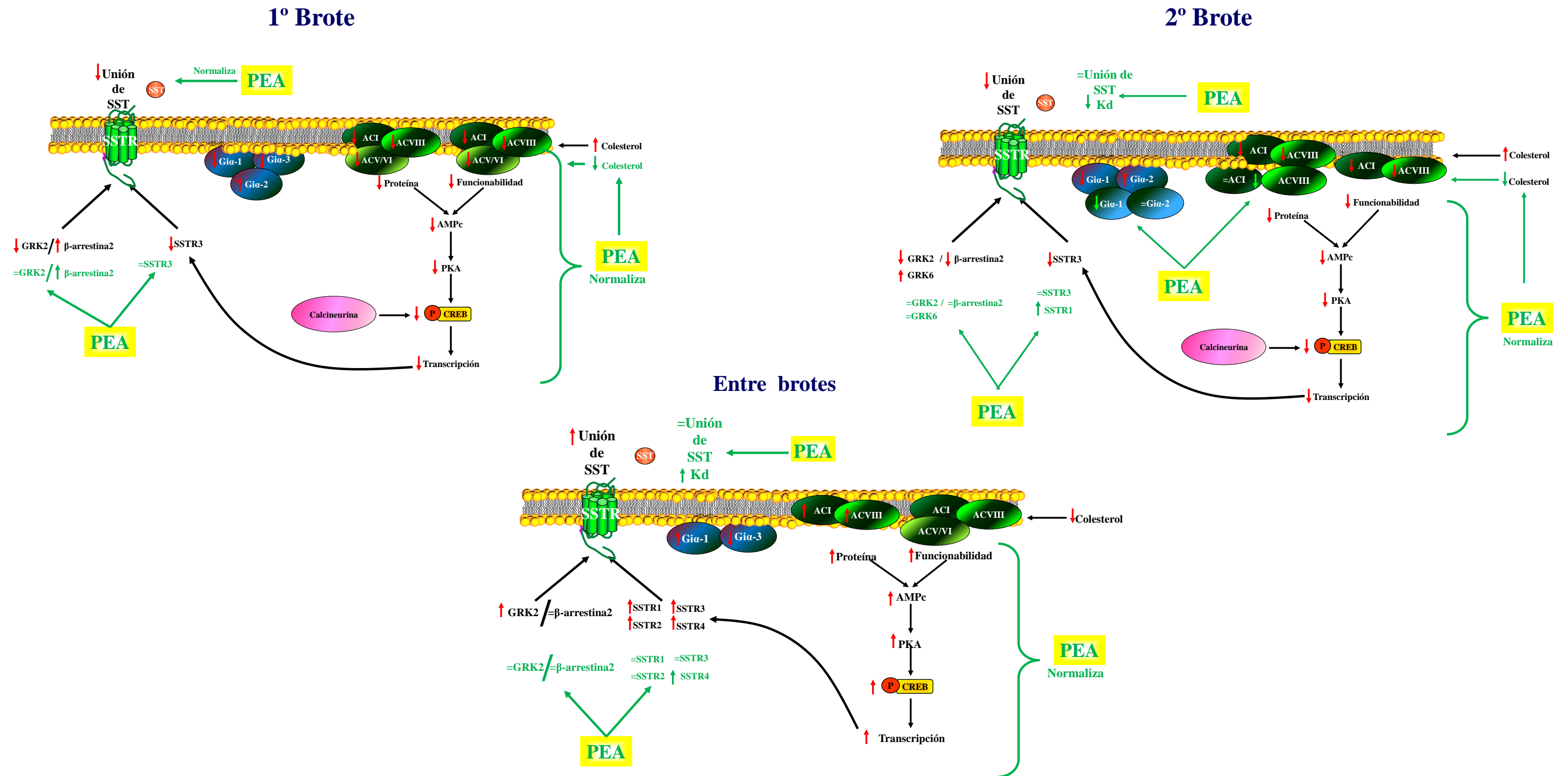


Figura 99: Esquema representativo de las alteraciones del sistema somatostatinérgico en las tres fases de la enfermedad. Las flechas rojas muestran los resultados en las ratas con EAE-CR y las flechas verdes indican el efecto de la sal de PEA sobre las alteraciones que ocurren en las ratas con EAE-CR

Conclusiones

“La ciencia a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tenderán siempre delante, un infinito”
[Gregorio Marañón]

CONCLUSIONES:

- 1- La administración de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina a las ratas, dos días antes de la inducción de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante, retrasa la aparición de los signos clínicos de la enfermedad y disminuye la severidad de los mismos.
- 2- En la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante, nuestros resultados sugieren que existe una movilización de células inmunológicas entre bazo, sangre periférica y parénquima cerebral a lo largo de los tres periodos de la enfermedad. Nuestros resultados en las ratas pretratadas con la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina indican que dicha sal modula esta movilización celular.
- 3- El cerebelo, área cerebral implicada en el control del movimiento, presenta infiltrados inflamatorios en las ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante desde el primer brote de la enfermedad, lo que podría explicar, al menos en parte, las alteraciones motoras que sufren dichos animales. La sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina disminuye los infiltrados en esta área cerebral, mejorando los signos motores observados.
- 4- El hipocampo y los cuerpos mamilares, áreas cerebrales que forman parte del circuito de Papez y que están implicados en procesos cognitivos, presentan infiltrados inflamatorios desde el primer brote de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante, siendo más acentuado en el segundo brote, lo cual podría relacionarse con los déficits cognitivos descritos por otros autores. La sal de calcio magnesio y potasio de fosfoetanolamina disminuye dichos infiltrados.
- 5- Además de los infiltrados inflamatorios encontrados en el hipocampo de las ratas enfermas, hay alteraciones en las defensas antioxidantes, principalmente en la actividad y cantidad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa y glutathion reductasa. Estos resultados podrían explicar el aumento de la peroxidación lipídica en las membranas de hipocampo descrito en el presente estudio. La sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina

- mejora el estado de las defensas antioxidantes y disminuye la peroxidación lipídica.
- 6- Los niveles de colesterol en membranas de hipocampo de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante aumentan de forma concomitante con la peroxidación lipídica en los tres brotes de la enfermedad. La administración de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina normaliza el grado de peroxidación lipídica y restablece los niveles de colesterol a los valores control, sugiriendo un papel de la fosfoetanolamina en mantener la integridad de la membrana.
 - 7- El sistema GRK/ β -arrestina, implicado en procesos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G, está alterado en el hipocampo de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante a lo largo de los tres periodos de la enfermedad. Esta alteración podría deberse al incremento de células inmunes en esta área cerebral así como al aumento de TNF- α , de IFN- γ y a la disfunción en las enzimas antioxidantes. La sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina mejora dichas alteraciones, probablemente por la disminución de las células inmunológicas.
 - 8- Las alteraciones en la unión de la somatostatina a sus receptores específicos en membranas de hipocampo de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante a lo largo de los tres periodos de la enfermedad podría deberse a las alteraciones en el sistema GRK/ β -arrestina así como a modificaciones en el contenido proteico de dichos receptores. El tratamiento con la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina revierte dichas alteraciones.
 - 9- La encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante induce una disminución en la actividad de la adenilato ciclasa en el hipocampo que se acompaña de una menor expresión de la adenilato ciclasa I, adenilato ciclasa V/VI y adenilato ciclasa VIII. La menor expresión de dichas isoformas junto con el aumento de los niveles de colesterol en la membrana podrían contribuir a la

menor funcionalidad de esta enzima. El tratamiento con la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina previene dichas alteraciones.

- 10-** Los presentes resultados muestran que la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante es un modelo idóneo para el estudio del curso crónico de la esclerosis múltiple así como para la valoración de potenciales tratamientos terapéuticos como es la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina.

En su conjunto, los presentes resultados sugieren que la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina retrasa la aparición y severidad de los signos clínicos de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante debido a una menor activación de las poblaciones linfocitarias, tanto en sangre periférica, en bazo, como en parénquima cerebral, y a su efecto antioxidante. Además, la sal de fosfoetanolamina es capaz de mantener la integridad del sistema de neurotransmisión somatostatinérgico en un área cerebral involucrado principalmente en procesos cognitivos. Por consiguiente, dicha sal podría ser un candidato potencial para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Bibliografía

“La ciencia avanza paso a paso” [Thomas Macaulay]

BIBLIOGRAFÍA

- 't Hart BA, Hintzen RQ, Laman JD (2009) Multiple sclerosis - a response-to-damage model. *Trends Mol Med* 15:235-244.
- 't Hart BA, Massacesi L (2009) Clinical, pathological, and immunologic aspects of the multiple sclerosis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neuropathol Exp Neurol* 68:341-355.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM (2007) The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148:32-46.
- Agea E, Russano A, Bistoni O, Mannucci R, Nicoletti I, Corazzi L, Postle AD, De Libero G, Porcelli SA, Spinozzi F (2005) Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. *J Exp Med* 202:295-308.
- Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E, Campos-Barros A, Puebla-Jiménez L, Barrios V (2005) Protective effects of insulin-like growth factor-I on the somatostatinergic system in the temporal cortex of beta-amyloid-treated rats. *J Neurochem* 92:607-615.
- Aguado-Llera D, Puebla-Jimenez L, Barrios V, Hernandez-Pinto A, Arilla-Ferreiro E (2011) Role of ethanolamine phosphate in the hippocampus of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Int* 58:22-34.
- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8:128-140.
- Allen JP, Hathway GJ, Clarke NJ, Jowett MI, Topps S, Kendrick KM, Humphrey PP, Wilkinson LS, Emson PC (2003) Somatostatin receptor 2 knockout/lacZ knockin mice show impaired motor coordination and reveal sites of somatostatin action within the striatum. *Eur J Neurosci* 17:1881-1895.
- Almolda B, Gonzalez B, Castellano B (2011) Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:1157-1171.
- Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B (2004) Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 291:1875-1879.
- Alvarez B, Radi R (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25:295-311.
- Amato MP, Langdon D, Montalban X, Benedict RH, DeLuca J, Krupp LB, Thompson AJ, Comi G (2013a) Treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis: position paper. *J Neurol* 260:1452-1468.
- Amato MP, Razzolini L, Goretti B, Stromillo ML, Rossi F, Giorgio A, Hakiki B, Giannini M, Pastò L, Portaccio E, De Stefano N (2013b) Cognitive reserve and cortical atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology* 80:1728-1733.
- Amedei A, Prisco D, D'Elis MM (2012) Multiple sclerosis: the role of cytokines in pathogenesis and in therapies. *Int J Mol Sci* 13:13438-13460.
- Ansonoff MA, Etgen AM (2001) Receptor phosphorylation mediates estradiol reduction of alpha2-adrenoreceptor to G protein in the hypothalamus of female rats. *Endocrine* 14(2): 165-174



- Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T (2003) Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 15:279-288.
- Arcaro A, Grégoire C, Boucheron N, Stotz S, Palmer E, Malissen B, Luescher IF (2000) Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J Immunol* 165:2068-2076.
- Arena S, Isella C, Martini M, de Marco A, Medico E, Bardelli A (2007) Knock-in of oncogenic Kras does not transform mouse somatic cells but triggers a transcriptional response that classifies human cancers. *Cancer Res* 67:8468-8476.
- Arriza JL, Dawson TM, Simerly RB, Martin LJ, Caron MG, Snyder SH, Lefkowitz RJ (1992) The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *J Neurosci* 12:4045-4055.
- Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I (2004) Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic Biol Med* 37:325-338.
- Ayoub SS, Wood EG, Hassan SU, Bolton C (2011) Cyclooxygenase expression and prostaglandin levels in central nervous system tissues during the course of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Inflamm Res* 60:919-928.
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393-404.
- Babior BM (1997) Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res* 30:141-155.
- Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Orci L (1979) Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science* 206:1323-1325.
- Bagert BA (2009) Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:405-410.
- Ballian N, Brunicardi FC, Wang XP (2006) Somatostatin and its receptors in the development of the endocrine pancreas. *Pancreas* 33:1-12.
- Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA (1999) Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 100:252-259.
- Baragli A, Alturaihi H, Watt HL, Abdallah A, Kumar U (2007) Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2 Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis. *Cell Signal* 19:2304-2316.
- Baratta MV, Lamp T, Tallent MK (2002) Somatostatin depresses long-term potentiation and Ca²⁺ signaling in mouse dentate gyrus. *J Neurophysiol* 88:3078-3086.
- Barber DL, Gregor M, Soll AH (1987) Somatostatin and muscarinic inhibition of canine enteric endocrine cells: cellular mechanisms. *Am J Physiol* 253:G684-689.
- Bari M, Spagnuolo P, Fezza F, Oddi S, Pasquariello N, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M (2006) Effect of lipid rafts on Cb2 receptor signaling and 2-arachidonoyl-glycerol metabolism in human immune cells. *J Immunol* 177:4971-4980.
- Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA (2003) Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin,



- and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2180-2184.
- Barlow CH, Harden WR, Harken AH, Simson MB, Haselgrove JC, Chance B, O'Connor M, Austin G (1979) Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain. *Crit Care Med* 7:402-406.
- Barnett P (2003) Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* 20:255-264.
- Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D (2012) B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 209:1001-1010.
- Basista MH, Stieffenhofer A, Kim DG, Murase N, Todo S, Dindzans VJ (1991) Procoagulant activity and tumor necrosis factor in rat hepatic allograft rejection. *Hepatology* 14:883-887.
- Basivireddy J, Somvanshi RK, Romero IA, Weksler BB, Couraud PO, Oger J, Kumar U (2013) Somatostatin preserved blood brain barrier against cytokine induced alterations: possible role in multiple sclerosis. *Biochem Pharmacol* 86:497-507.
- Basuroy S, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H (2009) Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C422-432.
- Baumeister H, Meyerhof W (2000) Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *J Physiol Paris* 94:167-177.
- Baxter AG, Smyth MJ (2002) The role of NK cells in autoimmune disease. *Autoimmunity* 35:1-14.
- Ben-Nun A, Cohen IR (1981) Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. *Eur J Immunol* 11:949-952.
- Ben-Shlomo A, Melmed S (2007) Pasireotide--a somatostatin analog for the potential treatment of acromegaly, neuroendocrine tumors and Cushing's disease. *IDrugs* 10:885-895.
- Benoit R, Ling N, Esch F (1987) A new prosomatostatin-derived peptide reveals a pattern for prohormone cleavage at monobasic sites. *Science* 238:1126-1129.
- Benov L (2001) How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* 217:33-36.
- Benveniste EN (1997) Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)* 75:165-173.
- Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, Urbani S, Deledda C, Cellai I, Francini F, Squecco R, Rosati F, Danza G, Gelmini S, Greeve I, Rossi M, Maggi R, Serio M, Peri A (2006) Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res* 312:2592-2604.
- Bielekova B (2013) Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 10:55-67.
- Bisaglia M, Venezia V, Biglieri M, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G (2004) alpha-Glycerylphosphorylethanolamine rescues astrocytes from mitochondrial impairment and oxidative stress induced by amyloid beta-peptides. *Neurochem Int* 44:161-170.



- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123 (Pt 6):1174-1183.
- Bobholz JA, Rao SM (2003) Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Neurol* 16:283-288.
- Bollók I, Vécsei L, Telegdy G (1983) The effects of interaction between propranolol and somatostatin on the active avoidance behavior, open-field activity and electroconvulsive shock-induced amnesia of rats. *Neuropeptides* 3:263-270.
- Borrajo A, Rodriguez-Perez AI, Diaz-Ruiz C, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014) Microglial TNF- α mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia* 62:145-157.
- Bosch B, Heipertz EL, Drake JR, Roche PA (2013) Major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complexes arrive at the plasma membrane in cholesterol-rich microclusters. *J Biol Chem* 288:13236-13242.
- Bostwick JR, Abbe R, Appel SH (1992) Phosphoethanolamine enhances high-affinity choline uptake and acetylcholine synthesis in dissociated cell cultures of the rat septal nucleus. *J Neurochem* 59:236-244.
- Brakch N, Galanopoulou AS, Patel YC, Boileau G, Seidah NG (1995) Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett* 362:143-146.
- Brand A, Gil S, Yavin E (2000) N-methyl bases of ethanolamine prevent apoptotic cell death induced by oxidative stress in cells of oligodendroglia origin. *J Neurochem* 74:1596-1604.
- Brenner T, Brocke S, Szafer F, Sobel RA, Parkinson JF, Perez DH, Steinman L (1997) Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 158:2940-2946.
- Brown GR, Thiele DL (2000) Enhancement of MHC class I-stimulated alloresponses by TNF/TNF receptor (TNFR)1 interactions and of MHC class II-stimulated alloresponses by TNF/TNFR2 interactions. *Eur J Immunol* 30:2900-2907.
- Brown KL, Davidson J, Rotondo D (2013) Characterisation of the prostaglandin E2-ethanolamide suppression of tumour necrosis factor- α production in human monocytic cells. *Biochim Biophys Acta* 1831:1098-1107.
- Brown M, Rivier J, Vale W (1977) Somatostatin: analogs with selected biological activities. *Science* 196:1467-1469.
- BROWNELL B, HUGHES JT (1962) The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25:315-320.
- Brunjes PC, Kay RB, Arrivillaga JP (2011) The mouse olfactory peduncle. *J Comp Neurol* 519:2870-2886.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1992) Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11151-11155.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1993) Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* 133:2561-2567.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M (1994) Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. *Endocrinology* 135:1787-1792.



- Butler RK, White LC, Frederick-Duus D, Kaigler KF, Fadel JR, Wilson MA (2012) Comparison of the activation of somatostatin- and neuropeptide Y-containing neuronal populations of the rat amygdala following two different anxiogenic stressors. *Exp Neurol* 238:52-63.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Butterfield DA, Calvani M, Pennisi G, Giuffrida Stella AM (2003) Disruption of thiol homeostasis and nitrosative stress in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis: evidence for a protective role of acetylcarnitine. *Neurochem Res* 28:1321-1328.
- Calzascia T, Masson F, Di Berardino-Besson W, Contassot E, Wilmotte R, Aurrand-Lions M, Rüegg C, Dietrich PY, Walker PR (2005) Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 22:175-184.
- Cao L, He C (2013) Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. *Neurosci Bull* 29:189-198.
- Carlson NG, Rojas MA, Redd JW, Tang P, Wood B, Hill KE, Rose JW (2010) Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. *J Neuroinflammation* 7:25.
- Carman CV, Springer TA (2004) A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 167:377-388.
- Ceballos I, Javoy-Agid F, Delacourte A, Defossez A, Lafon M, Hirsch E, Nicole A, Sinet PM, Agid Y (1991) Neuronal localization of copper-zinc superoxide dismutase protein and mRNA within the human hippocampus from control and Alzheimer's disease brains. *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 2:571-580.
- Celver J, Sharma M, Thanawala V, Christopher Ochteau J, Kovoov A (2013) Arrestin-dependent but G-protein coupled receptor kinase-independent uncoupling of D2-dopamine receptors. *J Neurochem* 127:57-65.
- Cervia D, Fiorini S, Pavan B, Biondi C, Bagnoli P (2002) Somatostatin (SRIF) modulates distinct signaling pathways in rat pituitary tumor cells; negative coupling of SRIF receptor subtypes 1 and 2 to arachidonic acid release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:200-209.
- Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC (2013) The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol* 4:63.
- Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, Miller SD (2011) The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812:265-274.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49:481-493.
- Cheng H, Yibchok-anun S, Coy DH, Hsu WH (2002a) SSTR2 mediates the somatostatin-induced increase in intracellular Ca(2+) concentration and insulin secretion in the presence of arginine vasopressin in clonal beta-cell HIT-T15. *Life Sci* 71:927-936.
- Cheng H, Yibchok-Anun S, Park SC, Hsu WH (2002b) Somatostatin-induced paradoxical increase in intracellular Ca2+ concentration and insulin release in the presence of arginine vasopressin in clonal HIT-T15 beta-cells. *Biochem J* 364:33-39.
- Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, Pfizenmaier K, Eisel U, Pitossi F (2011) Neuroprotective and neurodegenerative effects of the



- chronic expression of tumor necrosis factor α in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol* 227:237-251.
- Chiaravalloti ND, DeLuca J (2008) Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7:1139-1151.
- Cobelens PM, Kavelaars A, Heijnen CJ, Ribas C, Mayor F, Penela P (2007) Hydrogen peroxide impairs GRK2 translation via a calpain-dependent and cdk1-mediated pathway. *Cell Signal* 19:269-277.
- Cohen IR, Quintana FJ, Mimran A (2004) Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114:1227-1232.
- Comi C, Fleetwood T, Dianzani U (2012) The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity. *Autoimmun Rev* 12:150-156.
- Corness JD, Demchyshyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB (1993) A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides. *FEBS Lett* 321:279-284.
- Correale J, Villa A (2008) Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 195:121-134.
- Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI (2011) Vitamin D-mediated immune regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 311:23-31.
- Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U (2003) Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:289-301.
- Crameri A, Biondi E, Kuehnle K, Lutjohann D, Thelen KM, Perga S, Dotti CG, Nitsch RM, Ledesma MD, Mohajeri MH (2006) The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo. *Embo J* 25:432-443.
- Crise B, Rose JK (1992) Human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor retains a CD4-p56lck complex in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 66:2296-2301.
- Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE, Misko TP (1998) Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 88:45-56.
- Cross AH, Waubant E (2011) MS and the B cell controversy. *Biochim Biophys Acta* 1812:231-238.
- Csaba Z, Dournaud P (2001) Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 35:1-23.
- Csaba Z, Peineau S, Dournaud P (2012) Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking. *J Mol Endocrinol* 48:R1-12.
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2070-2075.
- Davis TL, Wiley RG (1989) Anti-Thy-1 immunotoxin, OX7-saporin, destroys cerebellar Purkinje cells after intraventricular injection in rats. *Brain Res* 504:216-222.
- De Filippis D, D'Amico A, Cinelli MP, Esposito G, Di Marzo V, Iuvone T (2009) Adelmidrol, a palmitoylethanolamide analogue, reduces chronic inflammation in a carrageenin-granuloma model in rats. *J Cell Mol Med* 13:1086-1095.



- de Oliveira MR, Silvestrin RB, Mello E Souza T, Moreira JC (2007) Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 28:1191-1199.
- Delacourte A, Defossez A, Ceballos I, Nicole A, Sinet PM (1988) Preferential localization of copper zinc superoxide dismutase in the vulnerable cortical neurons in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 92:247-253.
- Demchyshyn LL, Srikant CB, Sunahara RK, Kent G, Seeman P, Van Tol HH, Panetta R, Patel YC, Niznik HB (1993) Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. *Mol Pharmacol* 43:894-901.
- Dhib-Jalbut S (2002) Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 58:S3-9.
- Dineen RA, Bradshaw CM, Constantinescu CS, Auer DP (2012) Extra-hippocampal subcortical limbic involvement predicts episodic recall performance in multiple sclerosis. *PLoS One* 7:e44942.
- Ding S (2013) In vivo astrocytic Ca(2+) signaling in health and brain disorders. *Future Neurol* 8.
- Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2012) The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78:823-832.
- Dong L, Watanabe K, Itoh M, Huan CR, Tong XP, Nakamura T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Sakai T, Kawanami T, Sawaki T, Masaki Y, Fukushima T, Fujita Y, Tanaka M, Yano M, Okazaki T, Umehara H (2012) CD4+ T-cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. *Int Immunol* 24:327-337.
- Dubois PM, Paulin C, Assan R, Dubois MP (1975) Evidence for immunoreactive somatostatin in the endocrine cells of human foetal pancreas. *Nature* 256:731-732.
- Dun SL, Brailoiu GC, Tica AA, Yang J, Chang JK, Brailoiu E, Dun NJ (2010) Neuronostatin is co-expressed with somatostatin and mobilizes calcium in cultured rat hypothalamic neurons. *Neuroscience* 166:455-463.
- Durán N, Gisler GC, Diaz J (1984) Chemiluminescence from an erythrocyte folic acid oxidase from normal individuals and from cancer patients. *Physiol Chem Phys Med NMR* 16:325-331.
- Durán-Prado M, Bucharles C, Gonzalez BJ, Vázquez-Martínez R, Martínez-Fuentes AJ, García-Navarro S, Rhodes SJ, Vaudry H, Malagón MM, Castaño JP (2007) Porcine somatostatin receptor 2 displays typical pharmacological sst2 features but unique dynamics of homodimerization and internalization. *Endocrinology* 148:411-421.
- Durán-Prado M, Gahete MD, Martínez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, Benito-López P, Leal A, Schulz S, Gracia-Navarro F, Malagón MM, Castaño JP (2009) Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2634-2643.
- Durán-Prado M, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Castaño JP (2008) Dimerization of G protein-coupled receptors: new avenues for somatostatin receptor signalling, control and functioning. *Mol Cell Endocrinol* 286:63-68.



- Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD (2006) Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 59:478-489.
- E. O, A. M, E.M. W (2001) Utilidad de los análogos de somatostatina e tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos y tumores hipofisarios no productores de GH.
- Eijkelkamp N, Heijnen CJ, Carbajal AG, Willemen HL, Wang H, Minett MS, Wood JN, Schedlowski M, Dantzer R, Kelley KW, Kavelaars A (2012) G protein-coupled receptor kinase 6 acts as a critical regulator of cytokine-induced hyperalgesia by promoting phosphatidylinositol 3-kinase and inhibiting p38 signaling. *Mol Med* 18:556-564.
- Elong Ngono A, Pettré S, Salou M, Bahbouhi B, Soulillou JP, Brouard S, Laplaud DA (2012) Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 144:117-126.
- Emmanouil M, Taoufik E, Tseveleki V, Vamvakas SS, Tselios T, Karin M, Lassmann H, Probert L (2009) Neuronal I kappa B kinase beta protects mice from autoimmune encephalomyelitis by mediating neuroprotective and immunosuppressive effects in the central nervous system. *J Immunol* 183:7877-7889.
- Engelhardt B (2006) Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113:477-485.
- Engeli S (2012) Central and peripheral cannabinoid receptors as therapeutic targets in the control of food intake and body weight. *Handb Exp Pharmacol* 357-381.
- Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J (2005) Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 54:2838-2843.
- Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT (2008) Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience* 157:666-676.
- Epelbaum J, Lamour Y, Enjalbert A, Hamon M, Dutar P, Kordon C (1986) Modifications in the cortical regional distribution of choline acetyltransferase, somatostatin and somatostatin binding sites in the normal rat and following lesion of the nucleus basalis. *Brain Res* 371:376-379.
- Eren E, Yates J, Cwynarski K, Preston S, Dong R, Germain C, Lechler R, Huby R, Ritter M, Lombardi G (2006) Location of major histocompatibility complex class II molecules in rafts on dendritic cells enhances the efficiency of T-cell activation and proliferation. *Scand J Immunol* 63:7-16.
- Esposito E, Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Cuzzocrea S (2012) Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One* 7:e41880.
- Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Genovese T, Di Paola R, Galuppo M, Cuzzocrea S (2011) Effects of palmitoylethanolamide on release of mast cell peptidases and neurotrophic factors after spinal cord injury. *Brain Behav Immun* 25:1099-1112.
- Farina C, Weber MS, Meinel E, Wekerle H, Hohlfeld R (2005) Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 4:567-575.



- Fehlmann D, Langenegger D, Schuepbach E, Siehler S, Feuerbach D, Hoyer D (2000) Distribution and characterisation of somatostatin receptor mRNA and binding sites in the brain and periphery. *J Physiol Paris* 94:265-281.
- Fenton WA, Hack AM, Helfgott D, Rosenberg LE (1984) Biogenesis of the mitochondrial enzyme methylmalonyl-CoA mutase. Synthesis and processing of a precursor in a cell-free system and in cultured cells. *J Biol Chem* 259:6616-6621.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3):393-399.
- Fernandez AM, Fernandez S, Carrero P, Garcia-Garcia M, Torres-Aleman I (2007) Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci* 27:8745-8756.
- Ferone D (2010) Somatostatin and dopamine receptors. *Tumori* 96:802-805.
- Ferone D, Gatto F, Arvigo M, Resmini E, Boschetti M, Teti C, Esposito D, Minuto F (2009) The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol* 42:361-370.
- Feurer C, Prentice DE, Cammisuli S (1985) Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 10:159-166.
- Filiaci F, Zambetti G, Romeo R, Ciofalo A, Luce M, Germano F (1999) Non-specific hyperreactivity before and after nasal specific immunotherapy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 27:24-28.
- Fischer HG, Reichmann G (2001) Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166:2717-2726.
- Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, Gran B, Zhang GX, Rostami A (2007) Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:3268-3275.
- Florio T (2008) Somatostatin/somatostatin receptor signalling: phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol* 286:40-48.
- Florio T, Bajetto A, Thellung S, Arena S, Corsaro A, Bonavia R, Merlino M, Schettini G (1999) Prolonged treatment with alpha-glycerolphosphorylethanolamine facilitates the acquisition of an active avoidance behavior and selectively increases neuronal signal transduction in rats. *Aging (Milano)* 11:335-342.
- Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, Döpp E, van der Pol SM, Schadee-Eestermans IL, Nicolay K, Dijkstra CD, de Vries HE (2004) Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 127:616-627.
- Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001) Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14:547-560.
- Fogel LA, Yokoyama WM, French AR (2013) Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther* 15:216.
- Fontana A, Fierz W, Wekerle H (1984) Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307:273-276.
- Foote AK, Blakemore WF (2005) Repopulation of oligodendrocyte progenitor cell-depleted tissue in a model of chronic demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:374-383.



- Franklin RJ (2002) Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3:705-714.
- Fridovich I (1976) Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol* 74:530-539.
- Friese MA, Fugger L (2005) Autoreactive CD8⁺ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128:1747-1763.
- Friese MA, Jones EY, Fugger L (2005) MHC II molecules in inflammatory diseases: interplay of qualities and quantities. *Trends Immunol* 26:559-561.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107-144.
- Galanopoulou AS, Seidah NG, Patel YC (1995a) Direct role of furin in mammalian prosomatostatin processing. *Biochem J* 309 (Pt 1):33-40.
- Galanopoulou AS, Seidah NG, Patel YC (1995b) Heterologous processing of rat prosomatostatin to somatostatin-14 by PC2: requirement for secretory cell but not the secretion granule. *Biochem J* 311 (Pt 1):111-118.
- Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221:7-14.
- Garg P, Duncan RS, Kaja S, Koulen P (2010) Intracellular mechanisms of N-acylethanolamine-mediated neuroprotection in a rat model of stroke. *Neuroscience* 166:252-262.
- Garrett B, Finsen B, Wree A (1994) Parcellation of cortical areas by in situ hybridization for somatostatin mRNA in the adult rat: frontal, parietal, occipital, and temporal regions. *Anat Embryol (Berl)* 190:389-398.
- Gatto F, Hofland LJ (2011) The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 18:R233-251.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- Gay FW (2006) Early cellular events in multiple sclerosis. Intimations of an extrinsic myelinolytic antigen. *Clin Neurol Neurosurg* 108:234-240.
- Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM (1997) The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120 (Pt 8):1461-1483.
- German MS, Moss LG, Rutter WJ (1990) Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures. *J Biol Chem* 265:22063-22066.
- Gesquiere L, Loreau N, Minnich A, Davignon J, Blache D (1999) Oxidative stress leads to cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 27:134-145.
- Gibbins D, Befus AD (2009) CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J Leukoc Biol* 86:251-259.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2004) The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 251:261-268.
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-649.



- Glowinski J, Iversen LL (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 13:655-669.
- Goraya TA, Cooper DM (2005) Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signal* 17:789-797.
- Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9:393-407.
- Grant M, Patel RC, Kumar U (2004) The role of subtype-specific ligand binding and the C-tail domain in dimer formation of human somatostatin receptors. *J Biol Chem* 279:38636-38643.
- Greco A, Minghetti L, Levi G (2000) Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 25:1357-1364.
- Greenlee JE, Burns JB, Rose JW, Jaeckle KA, Clawson S (1995) Uptake of systemically administered human anticerebellar antibody by rat Purkinje cells following blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 89:341-345.
- Greenstein JI (2007) Current concepts of the cellular and molecular pathophysiology of multiple sclerosis. *Dev Neurobiol* 67:1248-1265.
- Greenwood MT, Hukovic N, Kumar U, Panetta R, Hjorth SA, Srikant CB, Patel YC (1997) Ligand binding pocket of the human somatostatin receptor 5: mutational analysis of the extracellular domains. *Mol Pharmacol* 52:807-814.
- Greenwood MT, Robertson LA, Patel YC (1995) Cloning of the gene encoding human somatostatin receptor 2: sequence analysis of the 5'-flanking promoter region. *Gene* 159:291-292.
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-212.
- Gromada J, Høy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P (2001) Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules. *J Physiol* 535:519-532.
- Guillemin R, Vale W, Grant G (1973) Chemistry of the hypothalamic releasing factors. Studies on structure-function relationships in TRF and LRF. *Vopr Biokhim Mozga* 8:141-176.
- Gutcher I, Becher B (2007) APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 117:1119-1127.
- Guy J, Ellis EA, Hope GM, Rao NA (1989a) Antioxidant enzyme suppression of demyelination in experimental optic neuritis. *Curr Eye Res* 8:467-477.
- Guy J, Ellis EA, Hope GM, Rao NA (1989b) Antioxidant enzymes reduce loss of blood-brain barrier integrity in experimental optic neuritis. *Arch Ophthalmol* 107:1359-1363.
- Guy J, Qi X, Hauswirth WW (1998) Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13847-13852.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307:108-112.
- Hansen HS (2010) Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Exp Neurol* 224:48-55.



- Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G (2000) N-Acylethanolamines and precursor phospholipids - relation to cell injury. *Chem Phys Lipids* 108:135-150.
- Hansen HS, Moesgaard B, Petersen G, Hansen HH (2002) Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. *Pharmacol Ther* 95:119-126.
- Hathway GJ, Emson PC, Humphrey PP, Kendrick KM (1998) Somatostatin potently stimulates in vivo striatal dopamine and gamma-aminobutyric acid release by a glutamate-dependent action. *J Neurochem* 70:1740-1749.
- Hattersley KJ, Hein LK, Fuller M (2013) Lipid composition of membrane rafts, isolated with and without detergent, from the spleen of a mouse model of Gaucher disease. *Biochem Biophys Res Commun* 442:62-67.
- Hauser F, Meyerhof W, Wulfsen I, Schönrock C, Richter D (1994) Sequence analysis of the promoter region of the rat somatostatin receptor subtype 1 gene. *FEBS Lett* 345:225-228.
- Havlicek V, Rezek M, Friesen H (1976) Somatostatin and thyrotropin releasing hormone: central effect on sleep and motor system. *Pharmacol Biochem Behav* 4:455-459.
- Hawes JJ, Picciotto MR (2004) Characterization of GalR1, GalR2, and GalR3 immunoreactivity in catecholaminergic nuclei of the mouse brain. *J Comp Neurol* 479:410-423.
- Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L (2011) Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler* 17:788-793.
- Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP (2006) Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2:201-211.
- Hernández C, García-Ramírez M, Corraliza L, Fernández-Carneado J, Farrera-Sinfreu J, Ponsati B, González-Rodríguez A, Valverde AM, Simó R (2013) Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes* 62:2569-2578.
- Hervás-Aguilar A, Puebla-Jiménez L, Burgos-Ramos E, Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E (2005) Effects of single and continuous administration of amyloid beta-peptide (25-35) on adenylyl cyclase activity and the somatostatinergic system in the rat frontal and parietal cortex. *Neuroscience* 135:181-190.
- Hofland LJ, Lamberts SW, Feelders RA (2010) Role of somatostatin receptors in normal and tumoral pituitary corticotropic cells. *Neuroendocrinology* 92 Suppl 1:11-16.
- Hollensworth SB, Shen C, Sim JE, Spitz DR, Wilson GL, LeDoux SP (2000) Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28:1161-1174.
- Holmøy T (2009) The discovery of oligoclonal bands: a 50-year anniversary. *Eur Neurol* 62:311-315.
- Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H (1998) Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:675-680.
- Hou C, Gilbert RL, Barber DL (1994) Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2. *J Biol Chem* 269:10357-10362.
- Hou TY, Monk JM, Fan YY, Barhoumi R, Chen YQ, Rivera GM, McMurray DN, Chapkin RS (2012) n-3 polyunsaturated fatty acids suppress

- phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent actin remodelling during CD4⁺ T-cell activation. *Biochem J* 443:27-37.
- Houslay MD, Hesketh TR, Smith GA, Warren GB, Metcalfe JC (1976) The lipid environment of the glucagon receptor regulates adenylate cyclase activity. *Biochim Biophys Acta* 436:495-504.
- Huang D, Rae-Grant A (2009) Advances in the immune pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9:20-31.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR (2010) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 24:1023-1034.
- Hökfelt T, Efendić S, Hellerström C, Johansson O, Luft R, Arimura A (1975) Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 200:5-41.
- Ilhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E (2004) Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med* 37:386-394.
- Izsepi E, Himer L, Szilagyi O, Hajdu P, Panyi G, Laszlo G, Matko J (2013) Membrane microdomain organization, calcium signal, and NFAT activation as an important axis in polarized Th cell function. *Cytometry A* 83:185-196.
- Jack C, Antel J, Brück W, Kuhlmann T (2007) Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. *Glia* 55:926-934.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 134:1151-1154.
- Jeong SW, Ikeda SR (2000) Effect of G protein heterotrimer composition on coupling of neurotransmitter receptors to N-type Ca(2⁺) channel modulation in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:907-912.
- Jinno S, Klausberger T, Marton LF, Dalezios Y, Roberts JD, Fuentealba P, Bushong EA, Henze D, Buzsáki G, Somogyi P (2007) Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J Neurosci* 27:8790-8804.
- Johnson AJ, Suidan GL, McDole J, Pirko I (2007) The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? *Int Rev Neurobiol* 79:73-97.
- Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK (2009) Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183:7169-7177.
- Kakalacheva K, Lünemann JD (2011) Environmental triggers of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585:3724-3729.
- Kang DS, Tian X, Benovic JL (2013) β -Arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. *Methods Enzymol* 521:91-108.
- Kang Y, Sun Y, Zhang J, Gao W, Kang J, Wang Y, Wang B, Xia G (2012) Treg cell resistance to apoptosis in DNA vaccination for experimental autoimmune encephalomyelitis treatment. *PLoS One* 7:e49994.
- Karpus WJ, Swanborg RH (1991) CD4⁺ suppressor cells inhibit the function of effector cells of experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *J Immunol* 146:1163-1168.
- Keegan BM, Noseworthy JH (2002) Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 53:285-302.



- Kharmate G, Rajput PS, Watt HL, Somvanshi RK, Chaudhari N, Qiu X, Kumar U (2011) Dissociation of epidermal growth factor receptor and ErbB2 heterodimers in the presence of somatostatin receptor 5 modulate signaling pathways. *Endocrinology* 152:931-945.
- Kim CH, Butcher EC, Johnston B (2002) Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol* 23:516-519.
- Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, Wujek J, Ravid R, Staugaitis SM, Lassmann H, Ransohoff RM (2004) Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol* 55:627-638.
- Kleibeuker W, Gabay E, Kavelaars A, Zijlstra J, Wolf G, Ziv N, Yirmiya R, Shavit Y, Tal M, Heijnen CJ (2008a) IL-1 beta signaling is required for mechanical allodynia induced by nerve injury and for the ensuing reduction in spinal cord neuronal GRK2. *Brain Behav Immun* 22:200-208.
- Kleibeuker W, Jurado-Pueyo M, Murga C, Eijkelkamp N, Mayor F, Heijnen CJ, Kavelaars A (2008b) Physiological changes in GRK2 regulate CCL2-induced signaling to ERK1/2 and Akt but not to MEK1/2 and calcium. *J Neurochem* 104:979-992.
- Koch A, Gaczkowski M, Sturton G, Staib P, Schinköthe T, Klein E, Rubbert A, Bacon K, Wassermann K, Erdmann E (2007) Modification of surface antigens in blood CD8+ T-lymphocytes in COPD: effects of smoking. *Eur Respir J* 29:42-50.
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751-5754.
- Koya V, Campbell AM, McLaughlin PJ, Tewari D, Wilson RP, Cooper TK (2012) Outbreak of abdominal distension and obstipation in a C57BL/6J experimental autoimmune encephalomyelitis study. *Vet Pathol* 49:528-531.
- Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ (2009) Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology* 30:785-793.
- Kramer D, Caruso A, Nicoletti F, Genazzani AA (2005) Somatostatin and the somatostatin receptor 2 are reciprocally controlled by calcineurin during cerebellar granule cell maturation. *J Neurochem* 94:1374-1383.
- Kraus J, Wöltje M, Schönwetter N, Höllt V (2000) Gene structure and regulation of the somatostatin receptor type 2. *J Physiol Paris* 94:199-204.
- Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM (1968) Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83:783-790.
- Kuczynski B, Reo NV (2006) Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem Res* 31:639-656.
- Kuehnle K, Cramer A, Kalin RE, Luciani P, Benvenuti S, Peri A, Ratti F, Rodolfo M, Kulic L, Heppner FL, Nitsch RM, Mohajeri MH (2008) Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 28:539-550.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002) Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125:2202-2212.
- Kujala P, Portin R, Ruutinen J (1996) Memory deficits and early cognitive deterioration in MS. *Acta Neurol Scand* 93:329-335.



- Kujala P, Portin R, Ruutinen J (1997) The progress of cognitive decline in multiple sclerosis. A controlled 3-year follow-up. *Brain* 120 (Pt 2):289-297.
- Kumar U (2005) Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 134:525-538.
- Kumar U (2011) Cross-talk and modulation of signaling between somatostatin and growth factor receptors. *Endocrine* 40:168-180.
- Kumar U, Grant M (2010) Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ* 50:137-184.
- Kwong YL, Chan AC, Liang RH (1997) Natural killer cell lymphoma/leukemia: pathology and treatment. *Hematol Oncol* 15:71-79.
- Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C (2004) Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1014:121-131.
- Lappas CM, Rieger JM, Linden J (2005a) A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 174:1073-1080.
- Lappas G, Daou GB, Anand-Srivastava MB (2005b) Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gialpha proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23:2251-2261.
- Lassmann H (1998) Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 4:93-98.
- Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW (1998) Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol* 86:213-217.
- Lauer K (2010) Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 10:421-440.
- Law SF, Manning D, Reisine T (1991) Identification of the subunits of GTP-binding proteins coupled to somatostatin receptors. *J Biol Chem* 266:17885-17897.
- Lee WT, Watson AR (2006) Single-cell analysis of lipid rafts in lymphocytes and in T cell-containing immunoconjugates. *Curr Protoc Toxicol* Chapter 2:Unit2.11.
- Legler DF, Doucey MA, Cerottini JC, Bron C, Luescher IF (2001) Selective inhibition of CTL activation by a dipalmitoyl-phospholipid that prevents the recruitment of signaling molecules to lipid rafts. *FASEB J* 15:1601-1603.
- Lepore S, Waiczies H, Hentschel J, Ji Y, Skodowski J, Pohlmann A, Millward JM, Paul F, Wuerfel J, Niendorf T, Waiczies S (2013) Enlargement of cerebral ventricles as an early indicator of encephalomyelitis. *PLoS One* 8:e72841.
- Lepousez G, Mouret A, Loudes C, Epelbaum J, Viollet C (2010) Somatostatin contributes to in vivo gamma oscillation modulation and odor discrimination in the olfactory bulb. *J Neurosci* 30:870-875.
- Levite M (1998) Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12544-12549.
- Li M, Wang X, Li W, Li F, Yang H, Wang H, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q, Fisher WE (2008) Somatostatin receptor-1 induces cell cycle arrest and inhibits tumor growth in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 99:2218-2223.



- Lichtenauer-Kaligis EG, van Hagen PM, Lamberts SW, Hofland LJ (2000) Somatostatin receptor subtypes in human immune cells. *Eur J Endocrinol* 143 Suppl 1:S21-25.
- Liossis SN, Sfikakis PP (2008) Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: potential effects on T cells. *Clin Immunol* 127:280-285.
- Liu JL, Papachristou DN, Patel YC (1994) Glucocorticoids activate somatostatin gene transcription through co-operative interaction with the cyclic AMP signalling pathway. *Biochem J* 301 (Pt 3):863-869.
- Liu JL, Patel YC (1995) Glucocorticoids inhibit somatostatin gene expression through accelerated degradation of somatostatin messenger ribonucleic acid in human thyroid medullary carcinoma (TT) cells. *Endocrinology* 136:2389-2396.
- Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC (2001) Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 158:2057-2066.
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K (2006) Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci* 26:12904-12913.
- Liu Y, Zhu B, Wang X, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS (2003) Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 139:27-35.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67:15-19.
- Lombardi MS, Kavelaars A, Cobelens PM, Schmidt RE, Schedlowski M, Heijnen CJ (2001) Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. *J Immunol* 166:1635-1640.
- Lombardi MS, Kavelaars A, Penela P, Scholtens EJ, Roccio M, Schmidt RE, Schedlowski M, Mayor F, Heijnen CJ (2002) Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 62:379-388.
- Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van de Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ (1999) Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 13:715-725.
- Lombardi MS, van den Tweel E, Kavelaars A, Groenendaal F, van Bel F, Heijnen CJ (2004) Hypoxia/ischemia modulates G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin-1 levels in the neonatal rat brain. *Stroke* 35:981-986.
- Lopez-Diego RS, Weiner HL (2008) Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis-a multifaceted adversary. *Nat Rev Drug Discov* 7:909-925.
- Love S (2006) Demyelinating diseases. *J Clin Pathol* 59:1151-1159.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, Kalman B (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 177:95-103.



- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717.
- Lyons JA, Ramsbottom MJ, Cross AH (2002) Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol* 32:1905-1913.
- MacKenzie-Graham A, Tiwari-Woodruff SK, Sharma G, Aguilar C, Vo KT, Strickland LV, Morales L, Fubara B, Martin M, Jacobs RE, Johnson GA, Toga AW, Voskuhl RR (2009) Purkinje cell loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimage* 48:637-651.
- MacMicking JD, Willenborg DO, Weidemann MJ, Rockett KA, Cowden WB (1992) Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J Exp Med* 176:303-307.
- Maeba R, Sawada Y, Shimasaki H, Takahashi I, Ueta N (2002) Ethanolamine plasmalogens protect cholesterol-rich liposomal membranes from oxidation caused by free radicals. *Chem Phys Lipids* 120:145-151.
- Maeba R, Ueta N (2003a) Ethanolamine plasmalogen and cholesterol reduce the total membrane oxidizability measured by the oxygen uptake method. *Biochem Biophys Res Commun* 302:265-270.
- Maeba R, Ueta N (2003b) Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers. *J Lipid Res* 44:164-171.
- Maeba R, Ueta N (2004) A novel antioxidant action of ethanolamine plasmalogens in lowering the oxidizability of membranes. *Biochem Soc Trans* 32:141-143.
- Maghzi AH, Marta M, Bosca I, Etemadifar M, Dobson R, Maggiore C, Giovannoni G, Meier UC (2011) Viral pathophysiology of multiple sclerosis: A role for Epstein-Barr virus infection? *Pathophysiology* 18:13-20.
- Mannara F, Valente T, Saura J, Graus F, Saiz A, Moreno B (2012) Passive experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: evidence of involvement of B cells. *PLoS One* 7:e52361.
- Mao P, Reddy PH (2010) Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta* 1802:66-79.
- Marracci GH, McKeon GP, Marquardt WE, Winter RW, Riscoe MK, Bourdette DN (2004) Alpha lipoic acid inhibits human T-cell migration: implications for multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 78:362-370.
- Marrie RA (2004) Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3:709-718.
- Mars LT, Saikali P, Liblau RS, Arbour N (2011) Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta* 1812:151-161.
- Martel G, Dutar P, Epelbaum J, Viollet C (2012) Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:154.
- Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Whitaker J, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF (1990) Fine specificity and HLA restriction of myelin basic



- protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 145:540-548.
- Martin R, McFarland HF (1995) Multiple sclerosis: are HLA class I molecules involved in disease pathogenesis? *Ann Neurol* 38:137-139.
- Mastrodimitou N, Lambrou GN, Thermos K (2005) Effect of somatostatin analogues on chemically induced ischaemia in the rat retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:44-53.
- Matsumoto Y, Kohyama K, Aikawa Y, Shin T, Kawazoe Y, Suzuki Y, Tanuma N (1998) Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 28:1681-1688.
- McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244:6056-6063.
- McDonald AJ, Mascagni F, Zaric V (2012) Subpopulations of somatostatin-immunoreactive non-pyramidal neurons in the amygdala and adjacent external capsule project to the basal forebrain: evidence for the existence of GABAergic projection neurons in the cortical nuclei and basolateral nuclear complex. *Front Neural Circuits* 6:46.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.
- McFarland HF, Martin R (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8:913-919.
- McLaughlin KA, Wucherpfennig KW (2008) B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Adv Immunol* 98:121-149.
- Medzhitov R, Janeway C (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338-344.
- Mehta PD, Lassmann H, Wisniewski HM (1981) Immunologic studies of chronic relapsing EAE in guinea pigs: similarities to multiple sclerosis. *J Immunol* 127:334-338.
- Merrill JE, Kono DH, Clayton J, Ando DG, Hinton DR, Hofman FM (1992) Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:574-578.
- Meyerhof W (1998) The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 133:55-108.
- Mikaeloff Y, Caridade G, Tardieu M, Suissa S, group Ks (2007) Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain* 130:2589-2595.
- Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS (2010) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15:Unit 15.11.
- Miller SD, McRae BL, Vanderlugt CL, Nikcevich KM, Pope JG, Pope L, Karpus WJ (1995) Evolution of the T-cell repertoire during the course of experimental immune-mediated demyelinating diseases. *Immunol Rev* 144:225-244.



- Millán J, Cerny J, Horejsi V, Alonso MA (1999) CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens* 53:33-40.
- Min C, Zheng M, Zhang X, Caron MG, Kim KM (2013) Novel roles for β -arrestins in the regulation of pharmacological sequestration to predict agonist-induced desensitization of dopamine D3 receptors. *Br J Pharmacol* 170:1112-1129.
- Minagar A (2013) Current and Future Therapies for Multiple Sclerosis. *Scientifica (Cairo)* 2013:249101.
- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202:13-23.
- Minami M, Yoshikawa H (1979) A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 92:337-342.
- Mirshafiey A, Mohsenzadegan M (2009) Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31:13-29.
- Mohammad MG, Hassanpour M, Tsai VW, Li H, Ruitenberg MJ, Booth DW, Serrats J, Hart PH, Symonds GP, Sawchenko PE, Breit SN, Brown DA (2012) Dendritic cells and multiple sclerosis: disease, tolerance and therapy. *Int J Mol Sci* 14:547-562.
- Montine KS, Quinn JF, Zhang J, Fessel JP, Roberts LJ, Morrow JD, Montine TJ (2004) Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids* 128:117-124.
- Morandi B, Bramanti P, Bonaccorsi I, Montalto E, Oliveri D, Pezzino G, Navarra M, Ferlazzo G (2008) Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res* 57:1-5.
- Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Maciel DR, Callegaro D (2002) [Historical aspects of multiple sclerosis]. *Rev Neurol* 34:379-383.
- MSIF (2013) The Atlas of EM. In: Mapping Multiple Sclerosis around the world, vol. 2 (Alan J Thompson, P. B., ed), p 28 London: Summers Editorial & Desing.
- Muller DM, Pender MP, Greer JM (2005) Blood-brain barrier disruption and lesion localisation in experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant cerebellar and brainstem involvement. *J Neuroimmunol* 160:162-169.
- Muraszko K, Sung C, Walbridge S, Greenfield L, Dedrick RL, Oldfield EH, Youle RJ (1993) Pharmacokinetics and toxicology of immunotoxins administered into the subarachnoid space in nonhuman primates and rodents. *Cancer Res* 53:3752-3757.
- Murthy KS, Coy DH, Makhoul GM (1996) Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem* 271:23458-23463.
- Muscettola M, Grasso G (1990) Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 180:419-430.
- Møller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ (2003) Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1616:1-84.
- Müller M, Carter SL, Hofer MJ, Manders P, Getts DR, Getts MT, Dreykluft A, Lu B, Gerard C, King NJ, Campbell IL (2007) CXCR3 signaling reduces the severity



- of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol* 179:2774-2786.
- Napoli I, Neumann H (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 225:24-28.
- NIEPER HA (1962) [Experimental bases and clinical uses of electrolyte-carrier compounds. 5. Orientational studies on potassium- and magnesium-2-aminoethanol phosphate (EAP)]. *Arztl Forsch* 16:I/641-642.
- NIEPER HA, BLUMBERGER K (1962) [Electrolyte carriers in experiments, laboratories and clinical practice. (I). Active ion transport therapy]. *Med Welt* 15:813-817.
- Niino M, Fukazawa T, Minami N, Amino I, Tashiro J, Fujiki N, Doi S, Kikuchi S (2012) CD5-positive B cell subsets in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 523:56-61.
- Nio DA, Moylan RN, Roche JK (1993) Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol* 150:5281-5288.
- Nossal GJ (1987) Current concepts: immunology. The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 316:1320-1325.
- O'Carroll AM, Lolait SJ, König M, Mahan LC (1992) Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol* 42:939-946.
- O'Carroll AM, Raynor K, Lolait SJ, Reisine T (1994) Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5. *Mol Pharmacol* 46:291-298.
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83:101-130.
- Oleszak EL, Zaczynska E, Bhattacharjee M, Butunoi C, Legido A, Katsetos CD (1998) Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:438-445.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W (2004) Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 89:1057-1091.
- Olivera A, Mizugishi K, Tikhonova A, Ciaccia L, Odom S, Proia RL, Rivera J (2007) The sphingosine kinase-sphingosine-1-phosphate axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis. *Immunity* 26:287-297.
- Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA (1990) T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183-187.
- Owens GP, Gilden D, Burgoon MP, Yu X, Bennett JL (2011) Viruses and multiple sclerosis. *Neuroscientist* 17:659-676.
- Ozturk A, Yousem DM, Mahmood A, El Sayed S (2008) Prevalence of asymmetry of mamillary body and fornix size on MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:384-387.
- Palumbo S, Bosetti F (2013) Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: Role of cyclooxygenase-2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 89:273-278.



- Palumbo S, Toscano CD, Parente L, Weigert R, Bosetti F (2012) The cyclooxygenase-2 pathway via the PGE₂ EP2 receptor contributes to oligodendrocytes apoptosis in cuprizone-induced demyelination. *J Neurochem* 121:418-427.
- Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC (1994) Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol* 45:417-427.
- Papachristou DN, Liu JL, Patel YC (1994) Cysteamine-induced reduction in tissue somatostatin immunoreactivity is associated with alterations in somatostatin mRNA. *Regul Pept* 49:237-247.
- Parekh VV, Wu L, Boyd KL, Williams JA, Gaddy JA, Olivares-Villagómez D, Cover TL, Zong WX, Zhang J, Van Kaer L (2013) Impaired autophagy, defective T cell homeostasis, and a wasting syndrome in mice with a T cell-specific deletion of Vps34. *J Immunol* 190:5086-5101.
- Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-1789.
- Pashenkov M, Teleshova N, Kouwenhoven M, Kostulas V, Huang YM, Soderstrom M, Link H (2002) Elevated expression of CCR5 by myeloid (CD11c+) blood dendritic cells in multiple sclerosis and acute optic neuritis. *Clin Exp Immunol* 127:519-526.
- Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198.
- Patel YC, Galanopoulou AS, Rabbani SN, Liu JL, Ravazzola M, Amherdt M (1997) Somatostatin-14, somatostatin-28, and prosomatostatin[1-10] are independently and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islet somatostatin tumor cells (1027B2). *Mol Cell Endocrinol* 131:183-194.
- Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB (1993) Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 192:288-294.
- Patel YC, Greenwood M, Panetta R, Hukovic N, Grigorakis S, Robertson LA, Srikant CB (1996) Molecular biology of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 45:31-38.
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB (1995) The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57:1249-1265.
- Patel YC, Murthy KK, Escher EE, Banville D, Spiess J, Srikant CB (1990) Mechanism of action of somatostatin: an overview of receptor function and studies of the molecular characterization and purification of somatostatin receptor proteins. *Metabolism* 39:63-69.
- Patel YC, Reichlin S (1978) Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology* 102:523-530.
- Patti F (2012) Treatment of cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1679-1699.
- Pedotti R, Musio S, Scabeni S, Farina C, Poliani PL, Colombo E, Costanza M, Berzi A, Castellucci F, Ciusani E, Confalonieri P, Hemmer B, Mantegazza R, Antozzi C (2013) Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis by passive transfer of IgG antibodies from a multiple sclerosis patient responsive to immunoadsorption. *J Neuroimmunol* 262:19-26.



- Pei X, Duan Z, Ma M, Zhang Y, Guo L (2014) Role of Ca/Ca_v2/NFAT signaling in IL-4 expression by splenic lymphocytes exposed to phthalate (2-ethylhexyl) ester in spleen lymphocytes. *Mol Biol Rep* 41:2129-2142.
- Pelletier G, Leclerc R, Dube D, Labrie F, Puviani R, Arimura A, Schally AV (1975) Localization of growth hormone-release-inhibiting hormone (somatostatin) in the rat brain. *Am J Anat* 142:397-401.
- Penela P, Ribas C, Mayor F (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15:973-981.
- Peyser JM, Rao SM, LaRocca NG, Kaplan E (1990) Guidelines for neuropsychological research in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 47:94-97.
- Pfeiffer M, Koch T, Schröder H, Laugsch M, Höllt V, Schulz S (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 277:19762-19772.
- Pierson BA, McGlave PB, Hu WS, Miller JS (1995) Natural killer cell proliferation is dependent on human serum and markedly increased utilizing an enriched supplemented basal medium. *J Hematother* 4:149-158.
- Pitkanen AS, Halonen TO, Kilpelainen HO, Riekkinen PJ (1986) Cholesterol esterase activity in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 74:45-53.
- Pittas F, Ponsonby AL, van der Mei IA, Taylor BV, Blizzard L, Groom P, Ukoumunne OC, Dwyer T (2009) Smoking is associated with progressive disease course and increased progression in clinical disability in a prospective cohort of people with multiple sclerosis. *J Neurol* 256:577-585.
- Pohl D (2009) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 286:62-64.
- Polak JM, Pearse AG, Grimelius L, Bloom SR (1975) Growth-hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. *Lancet* 1:1220-1222.
- Pollak Y, Ovadia H, Goshen I, Gurevich R, Monsa K, Avitsur R, Yirmiya R (2000) Behavioral aspects of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 104:31-36.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292-302.
- Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev II, Belogurov AA, Kurkova IN, Petrenko AG, Telegin GB, Suchkov SV, Kiselev SL, Lagarkova MA, Govorun VM, Serebryakova MV, Avasle B, Tornatore P, Karavanov A, Morse HC, Thomas D, Friboulet A, Gabibov AG (2006a) Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:281-286.
- Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev II, Belogurov AA, Telegin GB, Suchkov SV, Misikov VK, Morse HC, Gabibov AG (2006b) Catalytic activity of autoantibodies toward myelin basic protein correlates with the scores on the multiple sclerosis expanded disability status scale. *Immunol Lett* 103:45-50.
- Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A (1980) N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109:55-58.



- Prieto JC, Hueso C, Carmena MJ (1990) Modulation of the beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP accumulation in rat prostatic epithelial cells by membrane fluidity. *Gen Pharmacol* 21:931-933.
- Prineas JW, Graham JS (1981) Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Ann Neurol* 10:149-158.
- Pscherer A, Dörflinger U, Kirfel J, Gawlas K, Rüschoff J, Buettner R, Schüle R (1996) The helix-loop-helix transcription factor SEF-2 regulates the activity of a novel initiator element in the promoter of the human somatostatin receptor II gene. *EMBO J* 15:6680-6690.
- Puebla L, Mouchantaf R, Sasi R, Khare S, Bennett HP, James S, Patel YC (1999) Processing of rat preprocortistatin in mouse AtT-20 cells. *J Neurochem* 73:1273-1277.
- Pérez J, Rigo M, Kaupmann K, Bruns C, Yasuda K, Bell GI, Lübbert H, Hoyer D (1994) Localization of somatostatin (SRIF) SSTR-1, SSTR-2 and SSTR-3 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349:145-160.
- Qi X, Guy J, Nick H, Valentine J, Rao N (1997) Increase of manganese superoxide dismutase, but not of Cu/Zn-SOD, in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1203-1212.
- Quintela M, Señaris R, Heiman ML, Casanueva FF, Dieguez C (1997a) Leptin inhibits in vitro hypothalamic somatostatin secretion and somatostatin mRNA levels. *Endocrinology* 138:5641-5644.
- Quintela M, Señarís RM, Diéguez C (1997b) Transforming growth factor-betas inhibit somatostatin messenger ribonucleic acid levels and somatostatin secretion in hypothalamic cells in culture. *Endocrinology* 138:4401-4409.
- Rabbani SN, Patel YC (1988) Measurement and characterization of somatostatin-14-like immunoreactivity in human urine. *J Clin Endocrinol Metab* 66:1050-1055.
- Rabbani SN, Patel YC (1990) Peptides derived by processing of rat prosomatostatin near the amino-terminus: characterization, tissue distribution, and release. *Endocrinology* 126:2054-2061.
- Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP (1999) Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46:144-160.
- Raivich G, Banati R (2004) Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 46:261-281.
- Rakowska M, Jasińska R, Lenart J, Komańska I, Makowski P, Dygas A, Pikula S (1997) Membrane integrity and phospholipid movement influence the base exchange reaction in rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 168:163-176.
- Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G (2010) Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 9:727-739.
- Ramos-Ruiz R, Penela P, Penn RB, Mayor F (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* 101:2083-2089.
- Raulf F, Pérez J, Hoyer D, Bruns C (1994) Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR1-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion* 55 Suppl 3:46-53.



- Rausch M, Hiestand P, Baumann D, Cannet C, Rudin M (2003) MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn Reson Med* 50:309-314.
- Rawji KS, Yong VW (2013) The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol* 2013:948976.
- Ray A, Mann MK, Basu S, Dittel BN (2011) A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 230:1-9.
- Reichlin S (1986) Somatostatin: historical aspects. *Scand J Gastroenterol Suppl* 119:1-10.
- Reindl M, Kuenz B, Berger T (2010) B cells and antibodies in MS. *Results Probl Cell Differ* 51:99-113.
- Reisine T, Bell GI (1995a) Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* 16:427-442.
- Reisine T, Bell GI (1995b) Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience* 67:777-790.
- Reubi JC, Perrin MH, Rivier JE, Vale W (1981) High affinity binding sites for a somatostatin-28 analog in rat brain. *Life Sci* 28:2191-2198.
- Reynaert H, Geerts A (2003) Pharmacological rationale for the use of somatostatin and analogues in portal hypertension. *Aliment Pharmacol Ther* 18:375-386.
- Riedel CJ, Muraszko KM, Youle RJ (1990) Diphtheria toxin mutant selectively kills cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5051-5055.
- Rimmerman N, Bradshaw HB, Kozela E, Levy R, Juknat A, Vogel Z (2012) Compartmentalization of endocannabinoids into lipid rafts in a microglial cell line devoid of caveolin-1. *Br J Pharmacol* 165:2436-2449.
- Ringheim GE, Lee L, Laws-Ricker L, Delohery T, Liu L, Zhang D, Colletti N, Soos TJ, Schroeder K, Fanelli B, Tian N, Arendt CW, Iglesias-Bregna D, Petty M, Ji Z, Qian G, Gaur R, Weinstock D, Cavallo J, Telsinskas J, McMonagle-Strucko K (2013) Teriflunomide attenuates immunopathological changes in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Neurol* 4:169.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000a) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288:154-157.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC (2000b) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 275:7862-7869.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V (2010) Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139:675-684.
- Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schüle R (1993) Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4196-4200.
- Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG (2004) Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 149:40-49.
- Ruocco HH, Fernandes GA, Namer IJ, Depaulis A, Levy S (2004) Hypothalamic response to experimental allergic encephalomyelitis: role of substance P. *Neuroimmunomodulation* 11:28-35.



- Ruuls SR, Bauer J, Sontrop K, Huitinga I, 't Hart BA, Dijkstra CD (1995) Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 56:207-217.
- Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, Cayrol R, Prat A, Hall JA, Arbour N (2007) NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci* 27:1220-1228.
- Sajad M, Zargan J, Chawla R, Umar S, Sadaqat M, Khan HA (2009) Hippocampal neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): potential role of inflammation activated myeloperoxidase. *Mol Cell Biochem* 328:183-188.
- Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T (2010) Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ* 51:127-147.
- Samson WK, Zhang JV, Avsian-Kretchmer O, Cui K, Yosten GL, Klein C, Lyu RM, Wang YX, Chen XQ, Yang J, Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV, Yuan XB, Chang JK, Hsueh AJ (2008) Neuronostatin encoded by the somatostatin gene regulates neuronal, cardiovascular, and metabolic functions. *J Biol Chem* 283:31949-31959.
- Sanders P, De Keyser J (2007) Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain Res Rev* 54:274-285.
- Sassone-Corsi P (2012) The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS (2011) Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 585:3758-3763.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21:172-188.
- Scanlan N, Dufourny L, Skinner DC (2003) Somatostatin-14 neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with estrogen receptor alpha and somatostatin-28(1-12) immunoreactivity, and activation in response to estradiol. *Biol Reprod* 69:1318-1324.
- SCATCHARD G (1949) Equilibrium in non-electrolyte mixtures. *Chem Rev* 44:7-35.
- Schindler M, Humphrey PP, Emson PC (1996) Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 50:9-47.
- Schindler M, Sellers LA, Humphrey PP, Emson PC (1997) Immunohistochemical localization of the somatostatin SST2(A) receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 76:225-240.
- Schumann CM, Bauman MD, Amaral DG (2011) Abnormal structure or function of the amygdala is a common component of neurodevelopmental disorders. *Neuropsychologia* 49:745-759.
- Schwartz JP, Ji Z, Epelbaum J (1998) Somatostatin as a neurotrophic factor. Which receptor/second messenger transduction system is involved? *Perspect Dev Neurobiol* 5:427-435.
- Schwindinger WF, Robishaw JD (2001) Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 20:1653-1660.
- Scopinho AA, Guimarães FS, Corrêa FM, Resstel LB (2011) Cannabidiol inhibits the hyperphagia induced by cannabinoid-1 or serotonin-1A receptor agonists. *Pharmacol Biochem Behav* 98:268-272.



- Scott GS, Bolton C (2000) L-arginine modifies free radical production and the development of experimental allergic encephalomyelitis. *Inflamm Res* 49:720-726.
- Scott GS, Williams KI, Bolton C (1996) A pharmacological study on the role of nitric oxide in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. *Inflamm Res* 45:524-529.
- Scuderi C, Valenza M, Stecca C, Esposito G, Carratù MR, Steardo L (2012) Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- α . *J Neuroinflammation* 9:49.
- Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F (2000) Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 157:1991-2002.
- Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204:2899-2912.
- Sharma K, Patel YC, Srikant CB (1999) C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* 13:82-90.
- Shenoy M, Kaul R, Goluszko E, David C, Christadoss P (1994) Effect of MHC class I and CD8 cell deficiency on experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis. *J Immunol* 153:5330-5335.
- Shi Y, Feng Y, Kang J, Liu C, Li Z, Li D, Cao W, Qiu J, Guo Z, Bi E, Zang L, Lu C, Zhang JZ, Pei G (2007) Critical regulation of CD4⁺ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol* 8:817-824.
- Shimizu N, Kobayashi K, Hayashi K (1984) The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *J Biol Chem* 259:4414-4418.
- Shimon I (2003) Somatostatin receptors in pituitary and development of somatostatin receptor subtype-selective analogs. *Endocrine* 20:265-269.
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K (1985) Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1:1313-1315.
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219.
- Silwedel C, Förster C (2006) Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol* 179:37-45.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-808.
- Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A (2013) Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol* 171:8-19.
- Singh I, Paintlia AS, Khan M, Stanislaus R, Paintlia MK, Haq E, Singh AK, Contreras MA (2004) Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain Res* 1022:1-11.
- Smith KJ, McDonald WI (1999) The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1649-1673.



- Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hünig T, Becher B, Goebels N (2009) Collateral bystander damage by myelin-directed CD8⁺ T cells causes axonal loss. *Am J Pathol* 175:1160-1166.
- Somvanshi RK, Billova S, Kharmate G, Rajput PS, Kumar U (2009) C-tail mediated modulation of somatostatin receptor type-4 homo- and heterodimerizations and signaling. *Cell Signal* 21:1396-1414.
- Somvanshi RK, Chaudhari N, Qiu X, Kumar U (2011a) Heterodimerization of β_2 adrenergic receptor and somatostatin receptor 5: Implications in modulation of signaling pathway. *J Mol Signal* 6:9.
- Somvanshi RK, War SA, Chaudhari N, Qiu X, Kumar U (2011b) Receptor specific crosstalk and modulation of signaling upon heterodimerization between β_1 -adrenergic receptor and somatostatin receptor-5. *Cell Signal* 23:794-811.
- Somvanshi RK, Zou S, Qiu X, Kumar U (2014) Somatostatin receptor-2 negatively regulates β -adrenergic receptor mediated Ca(2+) dependent signaling pathways in H9c2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1843:735-745.
- Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
- Stein O, Oette K, Dabach Y, Hollander G, Ben Naim M, Stein Y (1992) Persistence of increased cholesteryl ester in human skin fibroblasts is caused by residual exogenous sphingomyelinase and is reversed by phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1165:153-159.
- Steinman L (2001) Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol* 2:762-764.
- Stengel A, Rivier J, Taché Y (2013) Modulation of the adaptive response to stress by brain activation of selective somatostatin receptor subtypes. *Peptides* 42:70-77.
- Sullivan PG, Springer JE, Hall ED, Scheff SW (2004) Mitochondrial uncoupling as a therapeutic target following neuronal injury. *J Bioenerg Biomembr* 36:353-356.
- Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2:168-184.
- Suzukawa M, Abbey M, Clifton P, Nestel PJ (1994) Effects of supplementing with vitamin E on the uptake of low density lipoprotein and the stimulation of cholesteryl ester formation in macrophages. *Atherosclerosis* 110:77-86.
- Svensson L, Abdul-Majid KB, Bauer J, Lassmann H, Harris RA, Holmdahl R (2002) A comparative analysis of B cell-mediated myelin oligodendrocyte glycoprotein-experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis in B cell-deficient mice reveals an effect on demyelination. *Eur J Immunol* 32:1939-1946.
- Sánchez-Muñoz I, Sánchez-Franco F, Vallejo M, Fernández A, Palacios N, Fernández M, Sánchez-Grande M, Cacicedo L (2011) Regulation of somatostatin gene expression by brain derived neurotrophic factor in fetal rat cerebrocortical cells. *Brain Res* 1375:28-40.
- Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP (2005) Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol* 66:222-230.
- Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AE, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR (2003) Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 119:170-183.
- Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A (2006) Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via



- glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* 281:21362-21368.
- Tamarit B, Bugault F, Pillet AH, Lavergne V, Bochet P, Garin N, Schwarz U, Thèze J, Rose T (2013) Membrane microdomains and cytoskeleton organization shape and regulate the IL-7 receptor signalosome in human CD4 T-cells. *J Biol Chem* 288:8691-8701.
- Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL (2008) Silencing preBötzing complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci* 11:538-540.
- Tashev R, Belcheva S, Milenov K, Belcheva I (2001) Behavioral effects of somatostatin microinjected into caudate putamen. *Neuropeptides* 35:271-275.
- ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM (2000) Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *Eur Cytokine Netw* 11:161-176.
- Terme M, Chaput N, Combadiere B, Ma A, Ohteki T, Zitvogel L (2008) Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol* 180:4679-4686.
- Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C (2005) Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4:32-41.
- Theodoropoulou M, Stalla GK (2013) Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*.
- Theodoropoulou M, Zhang J, Laupheimer S, Paez-Pereda M, Erneux C, Florio T, Pagotto U, Stalla GK (2006) Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing *Zac1* expression. *Cancer Res* 66:1576-1582.
- Tolón R, Franco FS, Villuendas G, Vicente AB, Palacios N, Caicedo L (2000) Potassium depolarization-induced cAMP stimulates somatostatin mRNA levels in cultured diencephalic neurons. *Brain Res* 868:338-346.
- Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N (2005) Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 21:1587-1600.
- Tonra JR, Reiseter BS, Kolbeck R, Nagashima K, Robertson R, Keyt B, Lindsay RM (2001) Comparison of the timing of acute blood-brain barrier breakdown to rabbit immunoglobulin G in the cerebellum and spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* 430:131-144.
- Toshniwal PK, Zarling EJ (1992) Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. *Neurochem Res* 17:205-207.
- Tostivint H, Joly L, Lihrmann I, Ekker M, Vaudry H (2004) Chromosomal localization of three somatostatin genes in zebrafish. Evidence that the [Pro2]-somatostatin-14 isoform and cortistatin are encoded by orthologous genes. *J Mol Endocrinol* 33:R1-8.
- Trapp BD, Bö L, Mörk S, Chang A (1999) Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol* 98:49-56.
- Tung YC, Ma M, Piper S, Coll A, O'Rahilly S, Yeo GS (2008) Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci* 28:12419-12426.
- van Doorn R, Nijland PG, Dekker N, Witte ME, Lopes-Pinheiro MA, van het Hof B, Kooij G, Reijerkerk A, Dijkstra C, van van der Valk P, van Horssen J, de Vries



- HE (2012) Fingolimod attenuates ceramide-induced blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis by targeting reactive astrocytes. *Acta Neuropathol* 124:397-410.
- van Hagen PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Anker-Lugtenburg PJ, Löwenberg B, Lamberts SW (1994) Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur J Clin Invest* 24:91-99.
- Venters HD, Dantzer R, Kelley KW (2000) A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci* 23:175-180.
- Vilcaes AA, Degano AL, López PH, Nores GA, Roth GA (2005) Antibodies which block anti-myelin basic protein antibodies associated with development of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats. *J Neuroimmunol* 164:31-36.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008) Somatostatinergic systems in brain: networks and functions. *Mol Cell Endocrinol* 286:75-87.
- Viollet C, Vaillend C, Videau C, Bluet-Pajot MT, Ungerer A, L'Héritier A, Kopp C, Potier B, Billard J, Schaeffer J, Smith RG, Rohrer SP, Wilkinson H, Zheng H, Epelbaum J (2000) Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci* 12:3761-3770.
- Viveros MP, de Fonseca FR, Bermudez-Silva FJ, McPartland JM (2008) Critical role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy metabolism, with phylogenetic, developmental, and pathophysiological implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:220-230.
- Vladimirova O, O'Connor J, Cahill A, Alder H, Butunoi C, Kalman B (1998) Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult Scler* 4:413-418.
- Vroon A, Heijnen CJ, Kavelaars A (2006) GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 80:1214-1221.
- Vroon A, Heijnen CJ, Raatgever R, Touw IP, Ploemacher RE, Premont RT, Kavelaars A (2004) GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. *J Leukoc Biol* 75:698-704.
- Vroon A, Kavelaars A, Limmroth V, Lombardi MS, Goebel MU, Van Dam AM, Caron MG, Schedlowski M, Heijnen CJ (2005) G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174:4400-4406.
- Vécsei L, Alling C, Widerlöv E (1990) Comparative studies of intracerebroventricularly administered cysteamine and pantethine in different behavioral tests and on brain catecholamines in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 305:140-151.
- Vécsei L, Bollók I, Telegdy G (1983) Intracerebroventricular somatostatin attenuates electroconvulsive shock-induced amnesia in rats. *Peptides* 4:293-295.
- Vécsei L, Widerlöv E (1990) Preclinical and clinical studies with cysteamine and pantethine related to the central nervous system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 14:835-862.
- War SA, Somvanshi RK, Kumar U (2011) Somatostatin receptor-3 mediated intracellular signaling and apoptosis is regulated by its cytoplasmic terminal. *Biochim Biophys Acta* 1813:390-402.



- Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJ (2001) Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet* 69:685-694.
- Weber MS, Hemmer B, Cepok S (2011) The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812:239-245.
- Wechsler A, Brafman A, Shafir M, Heverin M, Gottlieb H, Damari G, Gozlan-Kelner S, Spivak I, Moshkin O, Fridman E, Becker Y, Skaliter R, Einat P, Faerman A, Bjorkhem I, Feinstein E (2003) Generation of viable cholesterol-free mice. *Science* 302:2087.
- Wei XY, Zhao Y, Wong-Riley MT, Ju G, Liu YY (2012) Synaptic relationship between somatostatin- and neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Bötzinger complex of rats. *J Neurochem* 122:923-933.
- Wingerchuk DM (2012) Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord* 5:13-22.
- Wong WF, Looi CY, Kon S, Movahed E, Funaki T, Chang LY, Satake M, Kohu K (2014) T-cell receptor signaling induces proximal Runx1 transactivation via a calcineurin-NFAT pathway. *Eur J Immunol* 44:894-904.
- Woollett GR, Williams AF, Shotton DM (1985) Visualisation by low-angle shadowing of the leucocyte-common antigen. A major cell surface glycoprotein of lymphocytes. *EMBO J* 4:2827-2830.
- Wootla B, Denic A, Keegan BM, Winters JL, Astapenko D, Warrington AE, Bieber AJ, Rodriguez M (2011) Evidence for the role of B cells and immunoglobulins in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurol Res Int* 2011:780712.
- Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K (2004) Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* 432:640-645.
- Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T (2005) Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 163:24-30.
- Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF (1998) Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness. *Mol Cell Endocrinol* 139:71-77.
- Xu Y, Bruno JF, Berelowitz M (1995) Characterization of the proximal promoter region of the rat somatostatin receptor gene, SSTR4. *Biochem Biophys Res Commun* 206:935-941.
- Y.C. P (1992) *General Aspects of the Biology and Function of Somatostatin*. Berlin.
- Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S (1992a) Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:251-255.
- Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S (1992b) Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol* 6:2136-2142.
- Yamada Y, Stoffel M, Espinosa R, Xiang KS, Seino M, Seino S, Le Beau MM, Bell GI (1993) Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes



- 14, 17, and 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms. *Genomics* 15:449-452.
- Yang SK, Steyn F, Chen C (2012) Influence of membrane ion channel in pituitary somatotrophs by hypothalamic regulators. *Cell Calcium* 51:231-239.
- Yang W, Xia SH (2006) Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol* 12:7753-7757.
- Yeung M, Treit D (2012) The anxiolytic effects of somatostatin following intra-septal and intra-amygdalar microinfusions are reversed by the selective sst2 antagonist PRL2903. *Pharmacol Biochem Behav* 101:88-92.
- Yew DT, Chan WY, Luo CB, Zheng DR, Yu MC (1999) Neurotransmitters and neuropeptides in the developing human central nervous system. A review. *Biol Signals Recept* 8:149-159.
- Zager RA, Kalhorn TF (2000) Changes in free and esterified cholesterol: hallmarks of acute renal tubular injury and acquired cytoresistance. *Am J Pathol* 157:1007-1016.
- Zapata PD, Colas B, López-Ruiz P, Ropero RM, Martín RM, Rodríguez FJ, González FJ, López JI, Angulo JC (2004) [Phosphotyrosine phosphatase SHP-1, somatostatin and prostate cancer]. *Actas Urol Esp* 28:269-285.
- Zargari M, Allameh A, Sanati MH, Tiraihi T, Lavasani S, Emadyan O (2007) Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. *Neurosci Lett* 412:24-28.
- Zeng C, Lee JT, Chen H, Chen S, Hsu CY, Xu J (2005) Amyloid-beta peptide enhances tumor necrosis factor-alpha-induced iNOS through neutral sphingomyelinase/ceramide pathway in oligodendrocytes. *J Neurochem* 94:703-712.
- Zhang R, Tian A, Zhang H, Zhou Z, Yu H, Chen L (2011) Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by β -elemene treatment is associated with Th17 and Treg cell balance. *J Mol Neurosci* 44:31-40.
- Zheng J, Bizzozero OA (2010) Reduced proteasomal activity contributes to the accumulation of carbonylated proteins in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 115:1556-1567.
- Zheng J, Bizzozero OA (2011) Decreased activity of the 20S proteasome in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurochem* 117:143-153.
- Zhou Y, Sonobe Y, Akahori T, Jin S, Kawanokuchi J, Noda M, Iwakura Y, Mizuno T, Suzumura A (2011) IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *J Immunol* 186:4415-4421.
- Zhu J, Paul WE (2010) Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20:4-12.
- Zhu Y, Yakel JL (1997) Calcineurin modulates G protein-mediated inhibition of N-type calcium channels in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 78:1161-1165.
- Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA, Lieberthal W (1999) Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 338 (Pt 3):769-776.
- Zozulya AL, Wiendl H (2008) The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 4:384-398.



Páginas Web:

FDA Góberment newsroom.:

<http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm345528.htm>.

[Consultada en Febrero del 2014].

Imagen de portada modificada de: Imágenes HD ciencia:

<http://hq-pictures.ru/es/preview.php?hd=86758>. [Consultada Abril del 2014]

Anexo

*“El proceso de aprender un arte puede dividirse convenientemente en dos partes: una,
el dominio de la teoría; la otra, el dominio de la práctica”
[Erich Fromm]*

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Hasta el momento de su encuadernación, el presente trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Aránzazu Perianes Cachero. Capítulo: **“Efectos de la sal de calcio, magnesio y fosfato de etanolamina en un modelo animal de esclerosis múltiple”** (15-21). Libro: IV Jornadas de Jóvenes investigadores de la Universidad de Alcalá. **ISBN: 978-84-15834-15-1**. España (2013).
- Aránzazu Perianes Cachero. Capítulo: **“Bases moleculares de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante como modelo animal de la esclerosis múltiple”** (17-23). Libro: Jornadas de Jóvenes investigadores de la Universidad de Alcalá. **ISBN: 978-84-8138-925-8**. España (2011).

Además durante la realización de la presente Tesis Doctoral, el autor ha participado en otros proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones internacionales:

- Carmen Sobrino-Crespo, Aránzazu Perianes-Cachero, Lilian Puebla-Jiménez, Vicente Barrios, Eduardo Arilla-Ferreiro. **“Peptides and Food”** *Frontiers in Endocrinology*, section Diabetes. Aceptado
- Perianes-Cachero A, Burgos-Ramos E, Puebla-Jiménez L, Canelles S, Frago LM, Hervás-Aguilar A, de Frutos S, Toledo-Lobo MV, Mela V, Viveros MP, Argente J, Chowen JA, Arilla-Ferreiro E, Barrios V. **“Acute up-regulation of the rat brain somatostatin receptor-effector system by leptin is related to activation of insulin signaling and may counteract central leptin actions”**. *Neuroscience* 2013 Nov. 12(252):289-301.
- Alberto M Hernández-Pinto, Lilian Puebla-Jiménez, Aránzazu Perianes-Cachero; Eduardo Arilla. **“Vitamin E deficiency impairs the somatostatinergic receptor-effector system and leads to cell death in the rat hippocampus by a phosphotyrosine phosphatases overactivation”**. *J. Nutr Biochem*. 2013 May. 24(5):848-58.
- C. Sobrino-Crespo, A. Perianes-Cachero, L. Puebla-Jiménez, E. Arilla-Ferreiro **“Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica y receptores de somatostatina en hipocampo de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental”**. *Dianas*. 2(2):e20130906. Sept. 2013.
- Perianes-Cachero A, Burgos-Ramos E, Puebla-Jiménez L, Canelles S, Viveros MP, Mela V, Chowen JA, Argente J, Arilla-Ferreiro E, Barrios V. **“Leptin-induced downregulation of the rat hippocampal somatostatinergic system may potentiate its anorexigenic effects”**. *Neurochem. Int*. 2012 Dec: 61(8):1385-95.



- E. Arilla-Ferreiro, A.M. Hernández-Pinto, A. Perianes-Cachero and L. Puebla-Jiménez. Capítulo: **“Tocopherol: Sources, Uses and Health Benefits”**. Libro: Metabolism and function of vitamin E. ISBN: 978-1-62100-704-3. Reino Unido (2012).
- Burgos-Ramos E, Canelles S, Perianes-Cachero A, Arilla-Ferreiro E, Argente J, Barrios V. **“Adipose tissue promotes a serum cytokine profile related to lower insulin sensitivity after chronic central leptin infusion”**. PLoS One. 2012;7(10):e46893

También durante la realización de la presente Tesis Doctoral, el autor ha participado en congresos nacionales e internacionales:

- **Joint Meeting President's Poster Award** (Milán. Italia) 2013. “Up-regulation of hippocampal somatostatin receptors may attenuate acute leptin action after its central infusion”. Póster: P1-d1-311.
- **IV Jornadas de Jóvenes investigadores de la Universidad de Alcalá** (Alcalá de Henares. España) 2013. “Bases Moleculares de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante como modelo animal de la esclerosis múltiple”. Conferencia.
- **ESPE/LWPES** (Leipzig, Alemania) 2012. “Chronic leptin administration induce changes in circulating and adipose tissue inflammatory cytokines”. Póster: P1 - d1-240.
- **ESPE/LWPES** (Leipzig, Alemania) 2012. “Leptin induced depletion of hippocampal somatostatinergic system promotes its anorexigenic effectsreceptor”.Póster: P1 - d1-243.
- **36th FEBS Congress** Turin (Italia) 2011 "Effects of calcium, magnesium and phosphate ethanolamine salt on glutathione levels and activity in chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis". Póster
- **36th FEBS Congress** Turin (Italia) 2011 "Effects of PNU-120596, a positive allosteric modulator of alfa-7 nicotinic acetylcholine receptors on oxidative stress in the rat hippocampus in an animal model of Alzheimer's disease". Póster
- **XIV Congreso Nacional de la Sociedad española de Neurociencias (SENC)** (Salamanca. España) 2010. “Alteraciones del sistema somatostatinérgico hipocampal en ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante y efecto de la sal de fosfato de etanolamina”. Póster: P - 72.
- **XIV Congreso Nacional de la Sociedad española de Neurociencias (SENC)** (Salamanca. España) 2010. “El modulador alostérico positivo del receptor de acetilcolina nicotinérgico A7, PNU-120596 protege del estrés oxidativo causado por el péptido β -amiloide 25-35 en corteza temporal de la rata”. Póster: P - 61.
- **III Jornadas de Jóvenes investigadores de la Universidad de Alcalá** (Alcalá de Henares. España) 2010. “Efectos de la sal de calcio, magnesio y fosfato de etanolamina en un modelo animal de esclerosis múltiple”. Conferencia.
- **34th FEBS Congress** (Praga. República Checa) 2009. “Effects of vitamin A deficiency on somatostatin signaling and CREB phosphorylation in the rat hippocampus”. Póster: P 5 - 125 - L.



- **34th FEBS Congress** (Praga. República Checa) 2009. “Calcium-magnesium-phosphate ethanolamine provides protection against the impairment of the rat hippocampal antioxidant defense mechanisms in experimental autoimmune encephalomyelitis”. Póster: P 8 - 326 - L.
- **ESPE/LWPES** (Nueva York. EE.UU.) 2009. “The classical intracellular targets of leptin, SOCS3 and PTP1B, may modulate insulin signaling in the rat hypothalamus”. Póster: 73 (S3):39. Conferencia.
- **XXXI Congreso de la SEBBM** (Bilbao. España) 2008. “Efecto de la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica recidivante sobre la actividad y expresión de la adenilato ciclasa y de las proteínas Gi en el hipocampo de rata”. Póster: t17 - 18.
- **XXXI Congreso de la SEBBM** (Bilbao. España) 2008. “La deficiencia de vitamina E aumenta la actividad del sistema somatostatinérgico y la actividad fosfotirosina fosfatasa en el hipocampo de la rata”. Póster: t14 - 19.
- **XXXI Congreso de la SEBBM** (Bilbao. España) 2008. “La deficiencia de vitamina A modifica las defensas antioxidantes en el hipocampo de la rata”. Póster: t6 - 16.

FINANCIACIÓN

El presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos de investigación que se recogen a continuación:

Título de proyecto: “Estudio de los efectos de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfoetanolamina en la encefalomielitis autoinmune experimental en la rata”

Entidad financiadora: DGICYT SAF2006-09454

Duración: 2006-2009.

Título de proyecto: “Efectos de la inhibición de la proteína quinasa c-alfa y proteína quinasa C-teta y calcineurina en un modelo animal de esclerosis múltiple”

Entidad financiadora: Proyecto puente UAH

Duración: 2009-2010

Título de proyecto: “Efectos de la inhibición de la proteína quinasa c-alfa y proteína quinasa C-teta y calcineurina en un modelo animal de esclerosis múltiple”

Entidad financiadora: MICIN SAF2010- 22277

Duración: 2010-2013

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

Figura 1: Jean-Martin Charcot	3
Figura 2: Distribución mundial del riesgo de padecer EM	7
Tabla 1: Resumen de tipos de linfocitos Th.	12
Figura 3: Activación de las células T y diferenciación de células Th en función de las citoquinas del medio.....	14
Figura 4: Mecanismo de extravasación de linfocitos en la barrera hematoencefálica (BHE).	15
Figura 5: Esquema de la posible interacción entre los componentes celulares y moleculares en la esclerosis múltiple.	20
Figura 6: Cadena de oxidación y sistemas antioxidantes.	27
Figura 7: Estrés oxidativo en la fase degenerativa de la esclerosis múltiple.	30
Figura 8: Representación esquemática de los tipos de esclerosis múltiple en función de los signos clínicos.....	33
Figura 9: Representación esquemática del mecanismo de acción de los inmunomoduladores utilizados en el tratamiento de la esclerosis múltiple	38
Figura 10: Roger Guillemin (1924-act.).....	41
Figura 11: Estructura molecular de la somatostatina-14.....	42
Figura 12: Estructura química de la SST-14 y la SST-28 (A) y de los análogos de SST (B).....	43
Figura 13: Estructura del gen de la somatostatina de rata.....	44
Figura 14: Esquema de la síntesis y maduración de la somatostatina (SST) en mamíferos (Panel A) y representación esquemática de la estructura primaria de la neuronostatina (Panel B).	46
Tabla 2: Factores que regulan la transcripción del gen de la somatostatina	47
Figura 15: Regulación de la expresión del gen de la somatostatina mediante AMPc. .	48
Tabla 3: Factores que modulan la liberación de la somatostatina	50
Figura 16: Corte histológico de cerebro de rata. En amarillo se destaca la distribución de las células somatostatinérgicas.	51
Tabla 4: Distribución de las células somatostatinérgicas.	52
Figura 17: Órganos en los que actúa la somatostatina	53



Figura 18: Representación esquemática del receptor de somatostatina 2 A (SSTR2A) de rata.	60
Figura 20: Mecanismo de internalización y recirculación de los SSTR	66
Figura 21: Dimerización de receptores	67
Figura 22: Representación esquemática de la distribución de los receptores de somatostatina en el cerebro de rata.....	71
Tabla 5: Localización de los subtipos de receptores	72
Tabla 6: Proteínas G que se acoplan a cada subtipo de SSTR	74
Figura 23: Esquema de la estructura de la adenilato ciclasa (AC) de membrana, asociada a la subunidad α de la proteína G.....	75
Figura 24: Vías implicadas en la inhibición de la secreción mediada por la somatostatina.	79
Figura 25: Vías de señalización implicadas en la acción antiproliferativa de la somatostatina.	83
Figura 26: Fotografía del canal medular de un cobaya.	100
Figura 27: Fases de sangre tras la primera centrifugación.	103
Figura 28: Fases obtenidas tras la centrifugación en gradiente de densidad.....	104
Tabla 7: Criterios de definición para las poblaciones del sistema inmune examinadas.	107
Tabla 8: Combinación de anticuerpos para el estudio inmunofenotípico	109
Figura 29: Representación esquemática de la disección del cerebro, localización del hipocampo y fotografías del hipocampo diseccionado.....	111
Figura 30: Purificación de la Tyr ¹¹ -SST-14 marcada con ¹²⁵ I en una columna de Sephadex G-25.	116
Tabla 9: Relación anticuerpos primarios utilizados.	123
Figura 31: Curva estándar para la valoración de la producción de AMPc, por el método de la proteína enlazante.	125
Tabla 10: Diluciones de PKA y concentraciones de AMPc frío.	127
Figura 32: Curvas de desplazamiento de la unión de ³ H-AMPc a la PKA a diferentes diluciones de la misma	127
Tabla 11: Volúmenes a utilizar para adenilato ciclasa.	128



Tabla 12: Volumen de los reactivos para la determinación de la actividad glutathion reductasa	133
Tabla 13: Volumen de los reactivos para la determinación de la actividad glutathion reductasa.	134
Tabla 14: Volúmenes de reactivos para determinar la actividad SOD.....	137
Tabla 15: Diluciones de anticuerpos primarios para la inmunohistoquímica	141
Tabla 16: Agrupación en niveles de los grados de intensidad de la señal.....	144
Figura 35: Evolución de los signos clínicos de la enfermedad a lo largo del tiempo .	147
Tabla 17: Porcentaje de ratas en los distintos grados de la enfermedad	148
Figura 37: Evolución de la ingesta a lo largo de la enfermedad.	150
Tabla 18: Poblaciones de linfocitos T en sangre periférica en los tres periodos de la enfermedad.	152
Tabla 19: Poblaciones de linfocitos B y NK en sangre periférica en los tres periodos de la enfermedad.	153
Tabla 20: Poblaciones de linfocitos T en el bazo de rata en los tres periodos de la enfermedad.	154
Tabla 21: Poblaciones de linfocitos B y NK en el bazo de rata en los tres periodos de la enfermedad.	155
Figura 38: Niveles de TNF- α en suero de ratas.....	156
Figura 39: Niveles de IFN- γ en suero de ratas	157
Figura 40: Estudio histológico de las células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ en cerebelo de rata.	159
Figura 41: Histograma de células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ infiltradas en los lóbulos anteriores y 4º, 5º y 6º del cerebelo	161
Figura 42: Histograma de células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ infiltradas en los lóbulos 7º, 8º y 9º del cerebelo.....	162
Figura 43: Histograma del número de células Iba-1 ⁺ infiltradas en el cerebelo	163
Figura 44: Histograma del grado de activación de las células Iba-1 ⁺ en el cerebelo ..	163
Figura 45: Estudio de las células Iba-1 ⁺ en el cerebelo de rata.....	164
Figura 46: Estudio de la IgG en el cerebelo de rata	166
Figura 47: Histograma de los niveles de IgG en el cerebelo.....	167
Figura 48: Tinción de TUNEL en el cerebelo de rata	168
Figura 49: Histograma de células TUNEL ⁺ en todos los lóbulos del cerebelo	169



Figura 50: Tinción Fast Blue/PAS de cerebelo de rata.	171
Figura 51: Estudio histológico de las células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ en los cuerpos mamilares de rata	173
Figura 52: Histograma de células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ infiltradas en los cuerpos	175
Figura 53: Histograma representativo del número de células Iba-1 ⁺ infiltradas en los cuerpos mamilares	176
Figura 54: Estudio de las células Iba-1 ⁺ en los cuerpos mamilares de rata.	177
Figura 55: Histograma representativo del grado de activación de las células Iba-1 ⁺ en los cuerpos mamilares	178
Figura 56: Estudio de la inmunoglobulina G en los cuerpos mamilares de rata.	179
Figura 57: Histograma representativo de los niveles de inmunoglobulina G en los cuerpos mamilares	180
Figura 58: Tinción de TUNEL en los cuerpos mamilares de rata.....	181
Figura 59: Histograma de células TUNEL(+) en los cuerpos mamilares	182
Figura 60: Estudio histológico de las células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ en hipocampo de rata....	183
Figura 61: Histograma de células CD3 ⁺ y CD8 ⁺ infiltradas en el hipocampo	186
Figura 62: Estudio de las células Iba-1 ⁺ en el hipocampo de rata.....	188
Figura 63: Histograma representativo del número de células Iba-1 ⁺ infiltradas en el hipocampo	189
Figura 64: Histograma representativo del grado de activación de las células Iba-1 ⁺ en el hipocampo	189
Figura 65: Estudio de la IgG en el hipocampo de rata	190
Figura 66: Histograma representativo de los niveles de IgG en el hipocampo.....	191
Figura 67: Niveles de TNF- α en extracto (fracción soluble) de hipocampo.....	192
Figura 68: Niveles de IFN- γ en extracto (fracción soluble) de hipocampo	192
Figura 69: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de la calcineurina en hipocampo	193
Figura 70: Estudio de las células GFAP/PCNA en el hipocampo de rata.....	194
Figura 71: Tinción de TUNEL en el hipocampo de rata.....	196
Figura 72: Histograma de células TUNEL(+) en el hipocampo	197
Figura 73: Tinción Fast Blue/PAS del hipocampo de rata.....	198
Figura 74: Tinción Fast Blue/PAS del hipocampo a los cuerpos mamilares.	199



Figura 75: Niveles de malondialdehído en membranas de hipocampo.....	201
Figura 77: Niveles proteicos de la superóxido dismutasa en extracto de hipocampo.	203
Figura 78: Actividad catalasa en extracto de hipocampo.....	204
Figura 79: Niveles proteicos de la enzima catalasa en extracto de hipocampo	204
Figura 80: Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en extracto de hipocampo	206
Figura 81: Niveles proteicos de la enzima glutatión peroxidasa en extracto de hipocampo	206
Figura 82: Actividad enzimática de la glutatión reductasa en extracto de hipocampo	207
Figura 83: Niveles proteicos de la enzima glutatión reductasa en extracto de hipocampo	208
Figura 84: Niveles de glutatión total (GSH-t), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en extracto de hipocampo.....	209
Figura 85: Niveles de colesterol y desmosterol en membranas de hipocampo.....	210
Figura 86: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de las GRK en membranas de hipocampo.....	213
Figura 87: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de β -arrestina en membranas o en fracción citoplasmática de hipocampo	214
Figura 88: Niveles de somatostatina inmunoreactiva (SST-IR), determinada mediante radioinmunoanálisis (RIA), en el hipocampo.....	216
Figura 89: Unión de la somatostatina (SST) a sus receptores en los tres periodos de la enfermedad	217
Tabla 22: Parámetros de equilibrio de la unión de la somatostatina (SST) a sus receptores en membranas de hipocampo	218
Figura 90: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los receptores de somatostatina SSTR1 y SSTR2 presentes en el hipocampo	220
Figura 91: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de los receptores de somatostatina SSTR3 y SSTR4 presentes en el hipocampo	221
Figura 92: Estudio histológico del subtipo SSTR2 en hipocampo de rata.....	222



Tabla 23: Efecto de la somatostatina (SST, 10^{-4} M) y de la forskolina (FK, 10^{-5}) sobre la actividad adenilato ciclasa (AC) en membranas de hipocampo	225
Figura 93: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de las distintas isoformas de la AC.....	226
Figura 94: Análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de los inmunoblots de las proteínas Gi	228
Figura 95: Esquema representativo de la extravasación linfocitaria en el primer y segundo brote de la EAE-CR.	239
Figura 99: Esquema representativo de las alteraciones del sistema somatostatinérgico en las tres fases de la enfermedad.....	257